

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

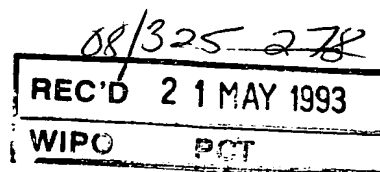
IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problems Mailbox.**

THIS PAGE BLANK (USPTO)

**PATENT- OCH
REGISTRERINGSVERKET**

Intyg
Certificate



Härmed intygas att bifogade kopior överensstämmer med de handlingar som ursprungligen ingivits till Patent- och registreringsverket i nedannämnda ansökan.

This is to certify that the annexed is a true copy of the documents as originally filed with the Patent- and Registration Office in connection with the following patent application.



71) Sökande Hightech Receptor AB, Malmö SE
Applicant (s)

PRIORITY DOCUMENT

(21) Patentansökningsnummer
Patent application number 9201331-7

(86) Ingivningsdatum
Date of filing 1992-04-28

Stockholm, 1993-04-21

För Patent- och registreringsverket
For the Patent- and Registration Office

Lennart Sundin
Lennart Sundin

Avgift
Fee 170:-

**PATENT- OCH
REGISTRERINGSVERKET
SWEDEN**

Postadress/Adress
Box 5055
S-102 42 STOCKHOLM

Telefon/Phone
+46 8 782 25 00
Vx 08-782 25 00

Telex
17978
PATOREG S

Telefax
+46 8 666 02 86
08-666 02 86

Protein-L och hybridproteiner därav

Föreliggande ansökan avser sekvenser av protein L, som binder till lätta kedjor av immunglobulin r. Uppfinningen avser även hybridproteiner därav, vilka hybridproteiner har förmåga att dels binda till lätta kedjor av alla Ig och att dels binda till både lätta och tunga kedjor av immunglobulin G, DNA-sekvenser som kodar för proteinerna, vektorer innehållande sådana DNA-sekvenser, värdceller transformerade med vektorerna, förfaranden för framställning av proteinerna, reagensutrustning för separation och identifikation av immunglobuliner, kompositioner samt farmaceutiska kompositioner, som innehåller proteinerna.

Uppfinningen avser i synnerhet DNA-sekvensen och aminosyra-sekvensen för de lättkedjebindande domänerna av protein L.

Proteiner som binder till immunglobuliners (Ig) konstanta domäner (med hög affinitet) är kända. Så binder protein A (från *Staphylococcus aureus*) (Forsgren, A. och Sjöquist, J. (1966) Protein A from *Staphylococcus aureus*. I. Pseudo-immun reaction with human gamma-globulin. J. Immunol. 97:822-827) till IgG från flera djurslag. Protein A's bindning till IgG medieras huvudsakligen via ytor i Fc-delen av IgG-molekylens tunga kedjor, men en viss bindning till ytor i Fab-delen av IgG sker även. Protein A saknar förmåga att binda till humant IgG3 och binder ej heller till IgG från flera andra djurslag, såsom viktiga laboratoriedjur t ex råtta och get, vilket begränsar användningen av protein A.

Protein G (Björck, L och Kronvall, G. (1984) Purification and some properties of streptococcal protein G, a novel IgG-binding reagent. J. Immunol. 133:969-974; Reis, K., Ayoub, E. och Boyle, M. (1984) Streptococcal Fc receptors. I. Isolation and partial characterization of the receptor from a group C streptococcus. J. Immunol. 132:3091-3097) binder till tung kedja i humant IgG och till dess av samtliga fyra sub-

kla ser sant till IgG från de flesta däggdjur inklusive råtta och g t.

Protein H (Åkesson, P., Cooney, J., Kishimoto, F. och Björck, L. (1990) Protein H - a novel IgG binding bacterial protein. Molec. Immun. 27:523-531) binder till Fc-fragmentet i IgG från människa, apa och kanin. Bindningen är dock svagare än hos protein G och A, vilket kan vara en fördel när man önskar bryta bindningen med svaga medel, t ex vid rening av proteiner som lätt denatureras med hjälp av antikroppar.

Protein M (sökandes patentansökan, PCT/SE 91100447) binder till Fc-fragmentet i IgG från människa, apa, kanin, get, mus och svin.

Protein L (Björck, L. (1988) Protein L, a novel bacterial cell wall protein with affinity for Ig L chains. J. Immunol. 140:1194-1197), som binder till de lätta kedjorna i immunoglobuliner från alla klasserna G, A, M, D och E är känt (USP 4 876 194). Aminosyrasekvensen och de bindande domänerna hos detta protein har dock hittills varit okända.

Ovan nämnda proteiner kan användas vid analys, rening och framställning av antikroppar samt för diagnostik och biologisk forskning.

Vid vissa autoimmuna sjukdomar kan eliminering av immunoglobuliner, med hjälp av s k plasmaferes, ha en gynnsam effekt. Då man i dessa sammanhang önskar eliminera samtliga klasser av antikroppar vore ett brett bindande protein en fördel.

Det har länge varit känt att man kan förebygga eller bota infektiösa tillstånd genom att tillföra immunserum, d v s serum som inn håller rikligt med antikroppar mot den aktuella organismen eller dess potentiellt skadliga produkt. Exempel härpå är epidemisk gulsot, stelkramp, difteri, rabies och generaliserad bältros. Även vid vissa icke infektiöst orsakade tillstånd kan antikroppar mot en toxisk produkt vara ef-

fektiva. Serum framställt i djur mot lika mgift r är den vanligaste tillämpningen härpå. Administr ring av s ra ll r antikroppsberedningar är emellertid inte h lt riskfri. I vissa fall kan man erhålla allvarliga immunologiska reakti n-
 5 er. Det har dessutom beskrivits enstaka fall av överföring av smittämnen såsom HIV och hepatit med dessa produkter. För att undvika dessa biverkningar har det varit önskvärt att fram-
 ställa terapeutiska antikroppar i provrör. En rad nya teknik-
 10 er för framställning av antikroppar i provrör har tagits fram under senare år. Exempel härpå är hybridomtekniken, syntes av chimär-antikroppar och framställning av antikroppar i bak-
 terier. Dessa tekniker gör det dessutom möjligt att special-
 designa antikroppar vilket ytterligare kan utvidga använd-
 15 ningen av sådana molekyler som terapeutika, exempelvis vid vissa tumörsjukdomar. Vid några av dessa nya förfaranden kommer emellertid produkten helt att sakna Fc-delen, till
 vilken samtliga de beskrivna IgG-bindande proteinerna, med undantag av protein L, binder. Det föreligger därför ett be-
 20 hov av reningsförfaranden för antikroppar för terapeutiskt bruk, varvid proteiner, som har bred bindningsaktivitet/
 specificitet, kan vara värdefulla.

Sedan länge har antikroppsreaktionen med sin höggradiga spe-
 cificitet kunnat utnyttjas för att diagnostisera genomgångna
 25 eller i vissa fall pågående infektioner med olika parasiter. Denna indirekta metod att påvisa infektiösa agens benämnes serologi och kan i många fall vara det enda diagnostiska
 alternativet. I vissa fall vore det även av intresse att kunna påvisa specifika IgE- eller IgA-antikroppar. Bestäm-
 30 ningen vid serologi går oftast till så att antigenet fästes på en fast fas, varefter serum från patienten inkuberas med antigenet. Antikrop ar från patienten som därvid bundit in kan sedan detekteras med olika metoder, oftast med hjälp av
 en sekundär antikropp (t ex riktad mot humana antikroppars lätta kedjor) vid vilk n någ n identifierbar markör har
 35 k pplats såsom alkaliskt fosfatas, bi tin, radioaktiv iso-
 top, fluor scein tc. I d esa sammanhang kan tt pr t in med bred Ig-bindand förmåga användas som tt alternativ
 till sekundära antikroppar.

Det finns även en rad icke terapeutiska och icke diagnostiska
 skäl till att man har behov av att binda antikroppar. Inom
 forskning n användes ofta antikroppar såväl för detekti n s n
 för rening av antigen mot vilka de är riktade. Alla tekniker
 5 som underlättar rening av antikroppar och i synnerhet sådana
 som tillåter rening av olika klasser är av intresse i detta
 sammanhang.

Det finns sålunda ett stort behov av ett protein, som har en
 10 bred bindningsaktivitet/specificitet och binder till flera
 olika klasser av immunglobuliner från olika djurarter. P n
 finns det inte något känt protein som binder till alla immu-
 globulinklasserna. De tidigare kända proteinerna A, G, H och
 M binder endast tung kedja i IgG. Det kända proteinet L
 15 (Björck et al., 1988) binder till de lätta α - och γ -kedjorna
 i immunglobuliner av alla klasser, dock betydligt svagare
 till α -kedjor. Sökanden har kartlagt protein L, bestämt
 aminosyrasekvensen för protein L, identifierat de lättkedje-
 bindande domänerna på protein L samt använt dessa för fram-
 20 ställning av hybridproteiner med de IgG-Fc-bindande domänerna
 av protein G. Sökanden kan genom protein LG visa att ett pro-
 tein med bredare bindningsaktivitet/specificitet därigenom
 kan åstadkommas. De ovan nämnda proteinerna A, G, H och M
 binder till samma eller mycket näraliggande ytor på IgG-Fc.
 25 Det lättkedjebindande proteinet L kan sålunda kombineras med
 vilket som helst av andra funktionellt likartade proteiner
 som binder till Fc-delen av tung kedja. En likartad breddning
 av Ig-bindande aktivitet åstadkommes med alla alternativen.

30 Uppfinningen avser sålunda den sekvens av protein L som
 binder till lätta kedjor i Ig och har den aminosyrasekvens,
 som anges i fig. 1 samt varianter, subfragment, multipler
 eller blandningar av domänerna B1-B5 med samma bindnings-
 35 egenskaper. Uppfinningen avser även en DNA-sekvens, som
 kodar för sådana prot insekvenser, t ex DNA-sekv ns n i
 fig. 1.

Uppfinningen avser tt hybridprotein, som kännetecknas av

att d t d ls består av domäner, som bind r till de lätta x- och λ -kedj rna i immunglobulin r av alla klass r, ant dels av domäner som bind r till tunga kedj r i immunglobulin G, varvid de domäner, som binder till de lätta kedjorna, väljs
 5 bland B1-, B2-, B3-, B4- och B5-domänerna i protein L (se fig. 1) och de domäner vilka binder till tunga kedjor av immunglobuliner väljs från C1-, C2- och C3-domänerna i protein G; A-, B- och C1-domänerna från protein H; A-, B1-, B2- och S-domänerna i protein M1 eller E-, D-, A-, B- och
 10 C-domänerna i protein A (se fig. 7) och varianter, subfragment, multipler eller blandningar av dessa domäner med samma bindningsegenskaper vilka binder till tunga kedjor av immunglobuliner.

Med subfragment förstås delfragment av de angivna domänerna eller fragment, som innehåller delar från de olika domänerna, med samma bindningsegenskaper. Med varianter förstås protein-
 15 er eller peptider, vari den ursprungliga aminosyrasekvensen modifierats eller förändrats genom insättning, addition, substitution, inversion eller uteslutning av en eller flera
 20 aminosyror, varvid dock bindningsegenskaperna bibehållits eller förbättrats. Uppfinningen avser även sådana proteiner som innehåller flera uppsättningar (multipler) av de bindande domänerna eller blandningar av de bindande domänerna
 25 med bibehållna bindningsegenskaper. Uppfinningen avser även blandningar av de olika domänerna till aminosyrasekvenser med samma bindningsegenskaper.

Uppfinningen avser i synnerhet ett hybridprotein benämnt LG, kännetecknat av att det innehåller B-domänerna i protein L, som binder till de lätta kedjorna i immunglobuliner, samt
 30 de till tunga kedjor bindande C1- och C2-domänerna i protein G med den i fig. 3 angivna aminosyrasekvensen. Uppfinningen avser även varianter, subfragment, multipler eller blandning-
 35 ar av d ssa domäner.

Prot in LG är ett hybridprot in med en molekylvikt om ca 50 kDa (432 aminosyror), som består av fyra domän r, vilka
 40 var och en bind r till lätta kedjor i immunglobuliner och

två IgG-bindande domäner från protein G. Hybridproteinet kombinerar en bred IgG-bindande aktivitet, härrörande från protin G's höggradiga bindningsförmåga till Fc-delen på den tunga kedjan på IgG med protein L's förmåga att binda till lätta kedjor på immunglobuliner av alla klasser. Protein LG binder således polyklont humant IgG, IgM, IgA, IgD och IgE. Affiniteten för humant polyklont IgG är $2 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}$. Samtliga fyra humana immunglobulinklasser bindes. Bindningen sker till humant IgG med såväl κ - och λ -kedja. Både Fc- och Fab-fragmentet av IgG binds av hybridproteinet. Proteinet binder även humana IgA-, IgD-, IgE- och IgM-antikroppar. Bindningen sker starkare till humana immunglobuliner som bär κ än till sådana som bär λ -isotypen av lätt kedja. IgG från de flesta däggdjur kommer att bindas av protein LG, således även IgG från get och ko, som ej binder till protein L. Kanin-IgG, som binder relativt svagt till protein L, binder emellertid bra till fusionsproteinet. IgM och IgA-antikroppar från mus, råtta och kanin kommer att bindas.

Proteinet LG är mycket lösligt. Det är värmetåligt och bevarar sina bindningsegenskaper även vid höga temperaturer. Bindningsegenskaperna kvarstår också i ett brett pH-intervall pH 3-10. Proteinet tål detergent och binder inmärkt protein efter separation i SDS-PAGE och överföring till membran med elektroblotting. Proteinet kan immobiliseras på fast fas (nitrocellulosa, Immobilon[®], polyakrylamid, plast, metall och papper) utan att förlora sina bindningsegenskaper. Bindningsegenskaperna påverkas ej av inmärkning med radioaktiva substanser, biotin eller alkaliskt fosfat. (Bindningsegenskaperna påvisas i Exempel 3).

Proteinet består av 432 aminosyror och har en härledd molekylvikt om 50 kDa. Sekvensen är uppbyggd av en till båda proteinerna orelaterad ala följd av de tre sista aminosyrorna i protein L's A-domän (val-glu-asn), varpå de fyra sinsemellan höggradigt homologa B-domänerna från protin L följer. Den första av B-domänerna består av 76 aminosyror, de övriga av 72 aminosyror vardera. De första nio aminosyrorna från den femte B-domänen ingår och följs av två r laterad amino-

syror (pro-met). Därpå följer protein G-sekvenser. Den sista aminosyran i den s k S-domänen från prot in G följs av en IgG-bindande domän från prot in G (C1; 55 aminosyror), den mellanliggande D-regionen (15 aminosyror) och den andra IgG-bindande C-domänen (C2; 55 aminosyror). Den sista aminosyran är en metionin, som finns i naturligt protein G som den första aminosyran i den s k W-regionen.

Uppfinningen avser även DNA-sekvenser, som kodar för de ovan nämnda proteinerna.

Den gen, som kodar för de IgG-bindande aminosyrasekvenserna kan isoleras från det kromosomala DNA't från *Staphylococcus aureus* baserat på informationen om DNA-sekvensen för protein A (S. Löfdahl, B. Guss, M. Uhlen, L. Philipsson och M. Lindberg. 1983. Gene for staphylococcal protein A. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 80:697-701) och fig. 7, eller från G-streptokocker, företrädesvis stam G 148 eller C-streptokocker, företrädesvis stam *Streptococcus equisimilis* C 40, baserat på informationen om protein G (B. Guss, M. Eliasson, A. Olsson, M. Uhlen, A.-K. Frej, H. Jörnvall, I. Flock och M. Lindberg. 1986. Structure of the IgG-binding regions of streptococcal protein G. EMBO. J. 5:1567-1575) och fig. 7, eller från grupp A-streptokocker, t ex *S. pyogenes* (typ M1) baserat på informationen om DNA-sekvensen för protein H (H. Gomi, T. Hozumi, S. Hattori, C. Tagawa, F. Kishimoto och L. Björck. 1990. The gene sequence and some properties of protein H - a novel IgG binding protein J. Immunol. 144:4046-4052) och fig. 7, eller från det kromosomala DNA't i grupp A-streptokocker typ M1 baserat på informationen om DNA-sekvensen för protein M (sökandes patentansökan, PCT/SE 911004.7 samt fig. 7 och 8. Den gen som kodar för det protein, som binder till lätta kedjor, kan isoleras från det kromosomala DNA't från *Peptococcus magnus* 312 baserat på informationen om DNA-sekvensen för protein L i fig. 1.

Med utnyttjand av d t från ovan nämnda bakteri r utvunna kromosomala DNA't som mall kan ett med hjälp av två synt tiska oligonukleotid r defini rat DNA-fragment sedan specifikt

förstärkas med hjälp av PCR (polymerase chain reaction). Denna metod tillåter också inkorporerandet av igenkänningsställen för restriktionsenzymer i ändarna av de förstärkta fragmenten (PCR technology, Ed: PCR Technology. Principles and Applications for DNA Amplification. Ed. Henry Erlich. Stockton Press, New York, 1989). Valet av igenkänningssekvenser kan anpassas efter den vektor som valts för att uttrycka fragmentet eller den eller de andra DNA-fragment med vilket det förstärkta fragmentet avses sättas samman.

Det förstärkta fragmentet klyvs därefter med det/de aktuella restriktionsenzymet, sätts samman med det/de andra fragment som är aktuella och fragmenten klonas därefter tillsammans i den utvalda vektorn (i detta fall expressions-vektorn) (Sambrook, J.E. Fritsch och T. Maniatis, 1989, Molecular cloning: A laboratory manual, 2nd Ed. Cold Spring Harbor Laboratories, Cold Spring Harbor, New York, USA). Plasmid-vektorn pHD313 kan användas (Dalbøge, H.E. Bech Jensen, H. Töttrup, A. Grubb, M. Abrahamson, I. Olafsson och S. Carlsen, 1989. High-level expression of active human cystatin C in Escherichia coli. Gene, 79: 325-332), alternativt någon av vektorerna i den så kallade PET-serien (PET 20, 21, 22, 23) som saluförs av Novagen (Madison, Wisconsin, USA).

Hybridproteinerna inkorporeras sedan i en lämplig värd, företrädesvis E.coli. Uppfinningen avser även sådana värdar i vilka hybridproteinerna inkorporerats.

Från de erhållna transformanterna kan de kloner, som producerar de önskade proteinerna selekteras med en känd metod (Fahnestock et al., J. Bacteriol. 167, 370 (1986)).

Sedan de proteiner, som kan binda till de lätta kedjorna i immunglobulinerna och till de tunga kedjorna i IgG, renats från de erhållna positiva klonerna med konventionella förfaranden, bestäms proteinernas bindningsspecificitet för val av den klonen, som producerar ett protein, som binder till de lätta kedjorna i immunglobulinerna och till de tunga kedjorna i IgG.

Sedan plasmid DNA't i nämnda klon isolerats med konventi-
la metoder bestäms DNA-sekvensen i det insatta materialet
med kända metoder (Sanger t al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA
74, 5463 (1977)).

5

Uppfinningen avser även DNA-sekvenser som hybridiserar med
nämnda identifierade DNA-sekvenser under konventionella be-
tingelser, och som kodar för ett protein, som har de önskade
bindningsegenskaperna. Strikta hybridiseringsbetingelser
föredrages.

10

Expressionen av generna kan utföras med expressionsvektorer,
som har de erforderliga kontrollregionerna för expression,
efter vilka regioner strukturgenen införes. Härför kan
strukturgenen, som visas i fig. 1 och 2 användas för protein
LG eller andra hybridproteiner med protein L.

15

När det gäller expressionsvektorer har olika värd-vektor-
system utvecklats, av vilka de mest lämpliga värd-vektor-
systemen kan väljas för expression av generna enligt
föreliggande uppfinning.

20

Föreliggande uppfinning avser även ett förfarande för fram-
ställning av hybridproteinerna enligt uppfinningen genom
odling av en värdcell, som transformeras med en expressions-
vektor, i vilken DNA't, som kodar för proteinerna enligt
uppfinningen, satts in.

25

Detta förfarande omfattar stegen

30

(1) insättning av ett DNA-fragment, som kodar för hybrid-
proteinerna, i en vektor;

(2) transformation av den resulterande vektorn in i en
lämplig värdcell;

(3) odling av den resulterande transformerad cell n
för framställning av det önskade hybridproteinet; och

35

(4) utvinning av proteinet från kultur n.

I det första steget införes det DNA-fragment, som kodar för hybridproteinet i en vektor, lämplig för den värd som skall användas för att uttrycka hybridproteinet. Insättningen av nämnda gen kan utföras genom att klyva vektorn med ett lämpligt restriktionsenzym, varefter man ligerar genen med vektorn.

I det andra steget införes vektorn med hybridplasmiden i värdceller. Värdcellerna kan vara *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* eller *Saccharomyces cerevisiae* eller andra lämpliga celler. Transformationen av expressions-hybridvektorn in i värdcellen kan utföras på konventionellt sätt och kloner, som transformerats, selekteras sedan.

I det tredje steget odlas de erhållna transformanterna i ett lämpligt medium för framställning av de önskade proteinerna genom expression av genen kodande för hybridproteinet.

I det fjärde steget utvinnes det önskade proteinet från odlingen och renas. Detta kan ske med kända metoder. T ex kan cellerna lyseras med kända förfaranden såsom behandling med ultraljud, enzymer eller mekanisk sönderdelning. Protein, som frigörs från cellerna eller utsöndras i mediet, utvinnes och renas med konventionella förfaranden, som ofta användas inom biokemin såsom jonbytkromatografi, gel-filtrering, affinitetskromatografi med användning av immunoglobuliner som ligander, hydrofob kromatografi eller omvänd faskromatografi. Dessa förfaranden kan användas var för sig eller i lämpliga kombinationer.

Såsom nämnts ovan kan proteinerna enligt föreliggande uppfin-
ning användas för bindning, identifiering eller rening av immu-
noglobuliner. De kan även bindas till läkemedel och användas i formuleringar med fördröjd frigivning. För dessa ändamål kan proteinet för ligga i en reagentutrustning eller farmaceutisk komposition i kombination med lämpliga reagenter, tillsatser eller bärare.

Pr teinerna kan tillhandahållas frystorkad eller i lösning bestående av PBS (fosfat-buffrad fysiologisk saltlösning) pH 7,2 med 0,02 % NaN_3 . De kan även användas uppkopplade på fast fas såsom kolhydratbaserade faser som CNBr-aktiverad sepharose, agaros, plastytter, polyakrylamid, nylon, papper, magnetkuler, filter, filmer. Proteinerna kan märkas med biotin, alkaliskt fosfat, radioaktiva isotoper, fluorescein och andra fluorescerande substanser, guldpartiklar, ferritin samt substanser som medger mätning av luminiscens.

Som bärare kan man även använda andra proteiner. Sådana bärare kan vara bundna till eller inkorporerade i proteinerna enligt uppfinningen. Sålunda kan man tänka sig att de hela proteinerna A, G, H, M betraktas som bärare för insatta sekvenser av protein L, som binder till lätta kedjor. Dessa bärare kan i sin tur vara bundna till de ovan nämnda bärarna.

Som farmaceutiska tillsatser kan användas sådana, som normalt användes inom denna teknik, såsom t ex farmaceutiska kvaliteter av mannitol, laktos, stärkelse, magnesiumstearat, natriumsackarat, talk, cellulosa, glykos, gelatin, sackaros, magnesiumkarbonat och liknande; utdryingningsmedel såsom laktos, dikalciumfosfat och liknande; sprängmedel såsom stärkelse eller derivat därav; smörjmedel såsom magnesiumstearat och liknande; bindemedel såsom stärkelse, gum arabicum, polyvinylpyrrolidon, gelatin, cellulosa och derivat därav och liknande.

Uppfinningen skall nu beskrivas närmare med hjälp av de bifogade ritningarna av vilka:

Fig. 1 visar aminosyra- och nukleinsyrasekvensen av de lättkedjebindande domänerna av protein L,

Fig. 2 visar plasmiden pHD389; den ribosomala bindningssekvensen, sekvensen för signalpeptiden från ompA samt igenkänningssekvens för flera restriktionsenzymer visas,

Fig. 3 visar aminosyra- och nukl insyrasekvensen för prot in LG,

Fig. 4 visar en schematisk översikt för framställning av protein L,

Fig. 5 visar en schematisk översikt för framställning av protein LG,

Fig. 6a, 6b och 6c visar en schematisk översikt för framställning av hybridproteinerna LA, LM resp. LH.

Fig. 7 visar en schematisk sammanfattande bild på protein A, G, H och M1. IgGFc-bindande domäner är för protein A: E, D, A, B och C; för protein G: C1, C2 och C3; för protein H: A och/eller B och för protein M1: A, B1, B2, B3 och S,

Fig. 8 visar aminosyra- och nukleinsyrasekvensen för protein M1,

Fig. 9 visar Western Blot för protein G, L och LG med vissa immunglobuliner och immunglobulinfragment,

Fig. 10 visar Slot-Blot för protein L, G och LG med IgG, Igx och Ig Fc.

Det skall dock observeras att ritningarna ej är skalnlige.

Exempel 1

Kloning och expression av de IgG-lättkedjebindande domänerna i protein L

Konstruktion av syntetiska oligonukleotider (primers) för förstärkning (amplifiering) av sekvenser kodande för protein L, domän B1-B4

Det är visat att en protein L peptid (uttryckt i E. coli) uppbyggd av sekvensen ala-val-glu-asn-domän B1 (från prot in L) binder till immunglobulinerna lätta kedjor (W. Kastern,

U. Sjöbring och L. Björck. 1992. Structure of peptide protein L and identification of a repeated immunoglobulin light chain-binding domain. J. Biol. Chem. (tryckning). Eftersom affiniteten av denna enkla protein L-domän för Ig är relativt låg, ($1 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$) och eftersom det naturligt förekommande protein L som är uppbyggt av flera sinsemellan likartade domäner (B1-B5) har högre affinitet för Ig ($1 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}$) har fyra av dessa domäner uttryckt tillsammans på följande sätt:

PL-N och PL-C1 är syntetiska oligonukleotider (tillverkade av den Biomolekylära enheten vid Lunds universitet, enligt patentsökandes instruktioner) vilka använts för att med PCR (Polymerase Chain Reaction) förstärka ett kloningsbart genfragment (kallat B1-B4), vilket kodar för fyra Ig-bindande protein L domäner (ala-val-glu-asn-B1-B2-B3-B4-lys-lys-val-asp-glu-lys-pro-glu-glu). Aminosyror i protein L-sekvensen anges för den primer som motsvarar den kodande strängen (PL-N):

PL-N: 5'-GCTCAGGCGGCCCGGTAGAAAATAAAGAAGAAACACCAGAAAC-3'
valgluasnlysgluthrproglu

5'-ändan av denna oligonukleotid är homolog med den kodande strängen i protein L-genen (understrukna): de kodoner som kodar för de tre sista aminosyrorna i A-domänen (val-glu-asn) följs av kodonerna för de sex första aminosyrorna i den första av de Ig-bindande domänerna i protein L (B1).

PL-C1: 5'-CAGCAGCAGGATTCTATTATTCTTCTGGTTTTTCGTCAACTTTCTT-3'

Denna oligonukleotid är homolog med den motsatta icke kodande strängen i genen för protein L (sekvensen motsvarar de nio första aminosyrorna i domän B5).

DNA-fragment som förstärkts med hjälp av PL-N innehåller igenkänningssekvensen för restriktionsenzymet HpaII (understrukna) omedelbart framför det kodons som kodar för den

första aminosyran (val) i det uttryckta protein L-fragmentet. Fragment som klyvts med *EpaII* kan ligas med DNA (i detta fall bestående av den använda expression vektorn pHD389) som klyvts med restriktionsenzymet *NotI*. DNA-fragment som klyvts med *EpaII* och ligerats med vektor pHD389 som klyvts med *NotI* kommer att translateras i rätt läsram. Konstruktionen orsakar translation av en extra aminosyra (ala) omedelbart framför den första aminosyran i protein L.

DNA-fragment som förstärkts med hjälp av PL-C1 kommer att innehålla igenkänningssekvensen för restriktionsenzymet *BamHI* (streck ovanför sekvensen) omedelbart efter den sekvens som kodar för den sista aminosyran i det uttryckta protein L-fragmentet (glu). Vektorn pHD389 innehåller en unik igenkänningssekvens för *BamHI* som del av dess sekvens multipla kloningssekvens, vilket följer efter igenkänningssekvensen för *NotI*. DNA-fragment som förstärkts med hjälp av PL-C1 kommer att innehålla två stop-kodoner (understruken) vilka gör att translation av det i vektorn insatta fragmentet upphör.

Den sekvens som avsågs förstärkas innehåller inga interna igenkänningssekvenser för restriktionsenzymerna *EpaII* eller *BamHI*.

Amplifierings- och kloningsprocedurer

(PCR) (Polymerase Chain Reaction) utfördes med ett protokoll som beskrivits av Saiki, R.D. Gelfand, S. Stoffel, S. Scharf, R. Higuchi, G. Horn, K. Mullis och H. Erlich, 1988; Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239: 487-49127; PCR utfördes i en Hybaid Intelligent Heating-block (Teddington, UK): 100 µl av en reaktionsblandning innehöll 50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl, pH 8,3, 1,5 mM MgCl₂, 100 µg/ml gelatin, 300 µM med avseende på var och en av deoxynukleotiderna (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), (Pharmacia), 20 pmol av var och en av oligonukleotiderna PL-N och PL-C1, 10 µl av den target (mall) DNA-lösning innehållande 0,1 µg/ml av kromosomalt DNA från *Peptostreptococcus magnus*, strain 312. Blandningen täcktes med min rull (Sigma) och

DNA't denaturerades med upphettning till 98°C i 10 minuter. 2,5 units AmpliTaq (Perkin Elmer Cetus, Norwalk, CT) tillsattes och PCR utfördes därefter med 25 cykler bestående av ett denatureringssteg vid 94°C under 1 minut, följt av ett hybridiseringssteg vid 56°C i 1 minut och slutligen ett extensionsteg vid 72°C i 1 minut. Förstärkt DNA analyserades med elektrofores i agarosgel. Det förstärkta DNA't klyvdes med restriktionsenzymerna *EpaII* (Promega), (8 units/ μ g förstärkt DNA) och *BamHI* (Promega), (10 units/ μ g förstärkt DNA) vid 37°C. Den sålunda förstärkta och därefter klyvda DNA-produkten separerades medelst elektrofores i en 2% (vikt/volym) agarosgel (NuSieve agarose, FMC Biproducts) i TAE-buffert (40 mM Tris, 20 mM Na-acetat, 2 mM EDTA, pH 8,0). Det resulterande 930 baspar stora fragmentet skars ut ur gelen. Koncentrationen av DNA i den utskurna gelbiten uppskattades till 0,05 mg/ml. Agarosbiten innehållande det klyvda, förstärkta fragmentet smältes vid 65°C i ett vattenbad varefter det fick svalna till 37°C. 10 μ l (0,5 μ g) av detta DNA överfördes till ett halvmikrorör (Sarstedt), förvärmde till 37°C, varefter det omedelbart tillsattes 1 μ l av vektorn pHD389 vilken klyvts med *NarI* (Promega) och *BamHI*, 1 μ l 10xligas-buffert (Promega) och 1 μ l T4 DNA-ligas (Promega; 1 unit/ μ l). Ligeringsreaktionen fick äga rum vid 37°C under 6 timmar. Ligeringsreaktionen användes därefter för att transformera *E. coli*, stam LE392 vilka gjorts kompetenta enligt den rubidiumklorid/kalciumdiklorid-metod som beskrivits av Kushner (1978). Molekylärbiologiska standardmetoder har använts vid manipulation av DNA (Sambrook, J.E. Fritsch och T. Maniatis, 1989. Molecular cloning: A laboratory manual. 2nd. Ed. Cold Spring Harbor Laboratories, Cold Spring Harbor, New York, USA). De klyvnings- och ligeringsförhållanden som rekommenderats av tillverkaren för DNA-ligas och restriktionsenzymer har i övrigt följts.

Expressionssystem

Vektorn pHD389 (se fig. 2) är en modifierad variant av plasmiden pHD313 (Dalbøge, H.E. Bech Jensen, H. Tøttrup, A. Grubb, M. Abrahamson, I. Olafsson och S. Carlsen, 1989. High-

level expression of active human cystatin C in *Escherichia coli*. Gene, 79: 325-332). Vektorn som replikeras i *E. coli* (innehåller $\text{ori} = \text{region för replikation från plasmid pUC19}$) är konstruerad så att DNA-fragment som klonats in i klyvningsstället för *NarI* kommer att transkriberas och translateras efter och i omedelbar anslutning till signalpeptiden (21 aminosyror) från hölje-proteinet *ompA* från *E. coli*. Translationen kommer att initieras från kodon ATG kodande för den första aminosyran (metionin) i signalpeptiden. Denna konstruktion medger transport av den translaterade peptiden till det periplasmatiske rummet i *E. coli*. Detta är fördelaktigt då risken för degradering av den önskade produkten av i *E. coli* intracellulärt förekommande enzymer minskas. Dessutom är det enklare att rena peptider som exporterats till det periplasmatiske rummet. Omedelbart efter klyvningsstället för *NarI* finns unika igenkänningssekvenser (multipel kloningssekvens) för flera andra restriktionsenzymer, bl a *EcoRI*, *SalI* och *BamHI*. Sju nukleotider uppströms från ATG-kodonen i signalsekvensen från *ompA* finns en optimerad *Shine-Dalgarno*-sekvens (även kallad ribosomalt bindningsställe, RBS) vilken binder till en komplementär sekvens i 16S rRNA i ribosomerna och på så sätt avgör att translationen initieras på rätt plats. Transkriptionen av sådant DNA som co-transkriberas med signalsekvensen för *ompA* står under kontroll av P_R -promotorn från colifag λ . I vektorn finns också genen för *cI857* från colifag λ vars produkt nedreglerar transkription från P_R (och vars produkt uttryckes konstitutivt). Denna *cI857*-medierade nedreglering av transkription från P_R är värmekänslig. Transkriptionen som regleras från denna promotor kommer att avslutas med hjälp av en *rho*-oberoende transkriptionsavslutande sekvens (bildar en struktur i DNA't som gör att det DNA-beroende RNA-polymeraset hoppar av DNA-strängen) som är placerad i vektorn omedelbart efter den multipla kloningssekvensen. Plasmiden bär vidare genen för β -laktamas (från plasmiden pUC19) vars produkt medger ampicillin-sensitivitet av *E. coli* kloner som transformerats med vektorn.

Sel kti n av pr tein L-producerand kl n r

De transformerad bakt ri rna utodlades på odlingsplatt r n d
LB-medium som också innehöll ampicillin i en koncentration av
100 µg/ml. Odling skedde över natt vid 30°C varefter de över-
fördes till odlingsskåp, 42°C, och odlades i ytterligare 4
timmar. Plattorna förvarades i kylskåp över natten. Påfölj-
ande dag överfördes kolonierna till nitrocellulosafilter.
Filter och odlingsplattor märktes så att överförda kolonier
senare lätt skulle kunna identifieras på odlingsplattan.
Odlingsplattorna inkuberades åter över natten vid 30°C så att
på plattor kvarvarande rester av överförda bakteriekolonier
åter skulle kunna tillväxa. Plattorna förvarades därefter i
kylskåp. Bakterierna i kolonierna på nitrocellulosa-avtrycket
lyserades genom att filtret inkuberades i 10% SDS under 10
minuter. Filter med lyserade bakterier sköljdes därefter med
en blockeringsbuffert bestående av PBS (pH 7,2) med 0,25%
gelatin och 0,25% Tween-20 (fyra bad, 250 ml vardera vid
37°C) varefter det inkuberades med radioaktivt (märkt med
¹²⁵I enligt chloramin-T-metoden) märkta Ig-α-kedjor (20 ng/ml
i PBS med 0,1% gelatin). Inkubationen skedde vid rumstempera-
tur under 3 timmar, varefter icke inbundet radioaktivt märkt
protein avsköljdes med PBS (pH 7,2) med 0,5 M NaCl, 0,25%
gelatin och 0,25% Tween-20 (fyra bad, 250 ml vardera vid
rumstemperatur). Samtliga filter exponerades för röntgenfilm.
Positiva kolonier identifierades på den ursprungliga odlings-
plattan. Kloner som reagerade med Ig-α-kedjor utvaldes och
analyserades med avseende på storleken på det i vektorn in-
troducerade DNA-fragmentet. En av dessa kloner utvaldes för
produktion av protein L, pHDL. Det i plasmid PHD389 introdu-
cerade DNA't från denna klon sekvenserades. DNA-sekvensen upp-
visade full överensstämmelse med motsvarande sekvens (B1-B4
samt 21 baser i B5) i genen för protein L från *Peptostrepto-*
coccus magnus, stam 312. Storlek och bindningsegenskaper
hos det protein som producerad av klon pHDL analyserad s
med hjälp av SDS-PAGE (s fig. 9), dot-blotexperim nt (se
fig. 10) och kompetitiva bindningsexperim nt.

Produktion av protein L

Flora kolonier från en odlingsplatta med *E. coli* pHDL användes för att inokulera en förkultur (LB-medium med tillsats av 100 mg/l ampicillin) som odlas vid 28°C över natt. Förkulturen överfördes på morgonen till en större volym (100 x volymen av förkulturen) färskt LB-medium med ampicillin (100 mg/l) och odlades i skak-kolv (200 rpm), (eller fermentor) vid 28°C. Då absorptionsvärdet vid 620 nm nått 0,5, höjdes odlingstemperaturen till 40°C (induktion av transkription). Odlingen pågick därefter under 4 timmar (gäller endast odling i skak-kolv). Då odlingen avslutats centrifugerades bakterierna ner. Bakterierna lyserades därefter med en osmotisk chockmetod vid 4°C (Dalbøge et al., 1989 supra). pH i lysatet ställdes till 7. Kvarvarande bakterierester centrifugerades ner varefter supernatanten renades på IgG-sepharose enligt tidigare beskrivna protokoll för protein G och protein L (U. Sjöbring, L. Björck och W. Kastern. 1991. Streptococcal protein G: Gene structure and protein binding properties. J. Biol. Chem. 266:399-405; W. Kastern, U. Sjöbring och L. Björck. 1992. Structure of peptostreptococcal protein L and identification of a repeated immunoglobulin light chain-binding domain. J. Biol. Chem. under tryckning).

Expressionssystemet gav ca 20 mg/l av protein L vid odling i skak-kolv. Deposition har gjorts vid DSSM, Identification Reference DSSM *E. coli* LE392/pHDL.

Exempel 2

Kloning och expression av protein LG

Konstruktion av oligonukleotider (primers) för förstärkning (amplifiering) av sekvenser kodande för protein LG

Protein L

Det har visats att protein L-peptid (uttryckt i *E. coli*) uppbyggd av sekvensen ala-val-glu-asn-domän B1 (från protein L) binder till immunoglobulinernas lätta kedjor (Kastern,

Sjöbring och Björck, 1992, J. Biol. Chem. under tryckning).
Eftersom affinitet n av den enkla domän för Ig är relativt
låg, ($1 \times 10^{-7} \text{ M}^{-1}$) och eftersom det naturligt förekommande
protein L som består av flera sinsemellan likartade domäner
(B1-B5) har högre affinitet för Ig ($1 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}$) har fyra
av dessa domäner uttryckts tillsammans på följande sätt:

PL-N och PL-C2 är syntetiska oligonukleotider (tillverkade
vid den Biomolekylära Enheten vid Lunds Universitet enligt
patentsökandes instruktioner) som med hjälp av PCR (Poly-
merase Chain Reaction) utnyttjats för att förstärka ett
kloningsbart genfragment, kallat B1-4, vilket kodar för
fyra Ig-bindande protein L domäner (ala-val-glu-asn-B1-B2-
B3-B4-lys-lys-val-asp-glu-lys-pro-glu-glu):

PL-N: 5'-GCTCAGGCGGCGCGGTTAGAAAATAAAGAAGAAACACCAGAAAC-3'
valgluasnlysglugluthrproglu

PL-C2: 5'-CAGCAGCAGCCATGGGTTCTTCIGGTTTTTCGTCAACTTTCTTA-3'

Aminosyror har angivits under motsvarande tripplett i den
kodande strängen. DNA-fragment som förstärkts med hjälp av
PL-N innehåller igenkänningssekvensen för restriktionsenzym-
et HpaII (understruken) omedelbart framför den tripplett som
kodar för den första aminosyran (val) i det uttryckta pro-
tein L-fragmentet. Fragment som klyvts med HpaII kan ligeras
med DNA (i detta fall den använda expressionsvektorn pHD389)
som klyvts med NarI. Konstruktionen orsakar translation av en
extra aminosyra (ala) omedelbart framför den första amino-
syran i protein L-fragmentet. DNA-fragment som förstärkts med
hjälp av PL-C2 kommer att innehålla igenkänningssekvensen för
restriktionsenzymet NcoI (understruken) omedelbart efter den
sekvens som kodar för den sista aminosyran i det uttryckta
protein L-fragmentet (glu). Förstärkta fragment som klyvts
med NcoI kan ligeras till det NcoI-klydda PCR-genererade pro-
met-asp-CDC-met-fragmentet (se nedan).

Protein G

Det är känt att en nk 1 C-domän från prot in G binder till IgG (B. Guss, M. Eliasson, A. Olsson, M. Uhlen, A.-K. Frej, H. Jörnvall, I. Flock och M. Lindberg. 1986. Structure of the IgG-binding regions of streptococcal protein G. EMBO. J. 5:1567-1575). Bindningsstyrkan av en enkel C-domän till IgG är relativt låg ($5 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$). Ett fragment som består av två C-domäner med en mellanliggande 15 aminosyror lång D-region har emellertid avsevärt högre affinitet till IgG ($1 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$). CDC-N och CDC-C är oligonukleotider som använts som PCR-primers för att förstärka ett kloningsbart DNA-fragment, benämnt CDC, vilket kodar för två IgG-bindande protein G-domäner (pro-met-asp-CDC-met).

CDC-N: GGCCATGGACACTTACAAATTAATCCTTAATGGT
metaspthrtyrlysleuileleuasngly

CDC-C: CAGGTCGACTTATTACATTTTCAGTTACCGTAAAGGTCTTAGT

Aminosyror i den resulterande sekvensen har angivits under den kodande strängens primer. DNA-fragment som förstärkts med hjälp av CDC-N innehåller igenkänningssekvensen för restriktionsenzymet NcoI (markerade med ett streck ovanför sekvensen). Klyvda amplifierade fragment kan ligeras med det fragment som förstärkts med hjälp av PL-C2 och därefter klyvts med NcoI. Fragmentet kommer därvid att translateras i rätt läsam. DNA-fragment som förstärkts med hjälp av CDC-C kommer att innehålla två s k stop-kodoner (understrukna) vilka gör att translation upphör. Omedelbart härefter finns igenkänningssekvensen för restriktionsenzymet SalI (markerade med ett streck ovanför sekvensen) vilken också återfinnes i expressionsvektorn PHD389 (se fig. 2).

De sekvenser som kodar för bindningsgenskaperna hos prot in L (B1-B5) resp. protein G (CDC) inn håller inga int rna igenkänningssekvenser för restriktionsnzymerna BpaII, SalI eller NcoI.

Amplifi rings- och kl ningsprocedurer

PCR (Polymerase Chain Reaction) utfördes enligt ett protokoll som beskrivits av Saiki et al., 1988; PCR utfördes i en Hybaid Intelligent Heating-block (Teddington, UK): 100 µl av reaktionsblandningen innehöll 50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl, pH 8,3, 1,5 mM MgCl₂, 100 µg/ml gelatin, 300 µM med avseende på var och en av deoxynukleotiderna (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), (Pharmacia). För att förstärka sekvenser som kodar för de lättkedjebindande delarna av protein L tillsattes 20 pmol av var och en av oligonukleotiderna PL-N och PL-C2, samt 10 µl av en DNA-lösning innehållande 0,1 mg/ml av kromosomalt DNA från *Peptostreptococcus magnus*, stam 312. Alternativt tillsattes 20 pmol vardera av oligonukleotidparet CDC-N och CDC-C samt 10 µl av en DNA-lösning innehållande 0,1 mg/ml av kromosomalt DNA från en grupp C streptokockstam (*Streptococcus equisimilis*) kallad C40 (U. Sjöbring, L. Björck och W. Kastern. 1991. Streptococcal protein G: Gene structure and protein binding properties. J. Biol. Chem. 266:399-405 eller med NcoI och SalI (10 U/µg PCR-produkt), (för CDC) vid 37°C. De sålunda förstärkta och därefter klyvda DNA-fragmenten separerades medelst elektrofores i en 2% (vikt/volym) agarosgel (NuSieve agarose, FMC Bioproducts) i TAE-buffert (40 mM Tris, 20 mM ana-cetat, 2 mM EDTA, pH 8,0). De resulterande fragmenten, 930 bp (för B1-4) resp. 390 bp (för CDC) skars ut ur gelen. Koncentrationen av DNA i de utskurna gelbitarna uppskattades till 0,05 mg/ml. Utskurna agaros-bitar innehållande de klyvda förstärkta fragmenten (B1-4 och CDC) smältes vid 65°C i ett vattenbad varefter de fick svalna till 37°C. 10 µl (0,5 µg) av detta DNA överfördes till ett halvmikrorör (Sarstedt), förvämt till 37°C, varefter 1 µl av vektorn pHD389 vilken klyvts med NarI och SalI tillsattes. Dessutom tillsattes 1 µl 10 x ligasbuffert (Promega) och 1 µl T4 DNA-ligas (1 unit/µl). Ligeringsreaktionen fick äga rum vid 37°C under 6 timmar. De klyvnings- och ligeringsförhållanden som rekommenderats av tillverkaren av DNA-ligas och -r striktionsenzymmer (Promega) har i övrigt följts. Ligeringsreaktionen används därför för att transformera *E. coli*, stam LE392 vilka gjorts kompetenta enligt den rubid-

iumklorid/kalciumdikalrid-metod som beskrivs av Kushnir (1978). Molekylärbiologiska standardmetoder har använts vid manipulation av DNA (Sambrook et al., 1989).

5 Experimentsystem

Vektorn pHD389 (se fig. 2) är en modifierad variant av plasmiden pHD313 (Dalbøge et al., 1989). Vektorn som replikeras i *E. coli* (innehåller origin of replication från plasmid pUC19) är konstruerad så att DNA-fragment som klonats in i klyvningsstället för *NarI* kommer att uttryckas omedelbart efter signalpeptiden (21 aminosyror) från hölje-proteinet *ompA* från *E. coli*. Translationen kommer att initieras från det ATG-kodon som kodar för den första aminosyran (metionin) i signalpeptiden. Konstruktionen med en *E. coli*-egen signalsekvens som föregår den önskade peptiden medger transport av den translaterade peptiden till det periplasmatiske rummet i *E. coli*. Detta är fördelaktigt då risken för degradering av den önskade produkten genom hos *E. coli* intracellulärt förekommande enzymer minskas. Dessutom är det enklare att rena peptider som exporterats till det periplasmatiske rummet. Omedelbart efter klyvningsstället för *NarI* finns unika igenkänningssekvenser (multipel kloningssekvens) för flera andra restriktionsenzymer, bl a *EcoRI*, *SalI* och *BamHI*. Sju nukleotider uppströms från ATG-kodonen i signalsekvensen från *ompA* finns en optimerad *Shine-Dalgarno*sekvens (kallas också ribosomalt bindningsställe, RBS) vilken binder till en komplementär sekvens i 16S rRNA i ribosomerna och på så sätt avgör att translationen initieras på rätt plats. Transkriptionen av sådant DNA som co-transkriberas med signalsekvensen för *ompA* står under kontroll av P_R -promotorn från colifag λ . I vektorn finns också genen för *cI857* från colifag λ vars produkt nedreglerar transkription från P_R och vars produkt uttryckes konstitutivt. Denna *cI857*-medierade nedreglering av transkription från P_R är värmekänslig. Transkription som regleras från denna promotor kommer att avslutas med hjälp av en *rho*-oberoende transkriptionsavslutande sekvens vilken insatts i vektorn omedelbart efter de multipla kloningsställena. Plasmiden bär vidare genen för β -laktamas (från

plasmid n pUC1 vars produkt medger ampicillin-selektion av *E. coli* kloner som transformats med vektorn.

Selektion av protin LG-producerad kloner

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

De transformerade bakterierna utodlades på odlingsplattor med LB-medium som också innehöll ampicillin i en koncentration av 100 µg/ml. Odling skedde över natt vid 30°C varefter de överfördes till odlingsskåp (42°C) och odlades i ytterligare 4 timmar. Plattorna förvarades i kylskåp över natten. Påföljande dag överfördes kolonierna till nitrocellulosafilter. Filter och odlingsplattor märktes så att överförda kolonier senare lätt skulle kunna identifieras på odlingsplattan. Odlingsplattorna inkuberades åter över natten vid 30°C så att på plattor kvarvarande rester av överförda bakteriekolonier åter skulle kunna tillväxa. Plattorna förvarades därefter i kylskåp. Bakterierna i kolonierna på nitrocellulosaavtrycket lyserades genom att filtret inkuberades i 10% SDS under 10 minuter. Filter med lyserade bakterier sköljdes därefter med en blockeringsbuffert bestående av PBS (pH 7,2) med 0,25% gelatin och 0,25% Tween-20 (fyra bad à 250 ml vid 37°C) varefter det inkuberades med radioaktivt (märkt med ^{125}I enligt chloramin-T-metoden) märkta Ig- α -kedjor (20 ng/ml i PBS med 0,1% gelatin). Inkubationen skedde vid rumstemperatur under 3 timmar, varefter icke inbundet radioaktivt märkt protein avsköljdes med PBS (pH 7,2) innehållande 0,5 M NaCl, 0,25% gelatin och 0,25% Tween-20 (fyra bad, 250 ml vardera vid rumstemperatur). Samtliga filter exponerades för röntgenfilm. Positiva kolonier identifierades på den ursprungliga odlingsplattan. Ett antal positiva kolonier utodlades på nya plattor och nya colony-blotexperiment utfördes med dessa plattor som utgångsmaterial för att identifiera *E. coli* kolonier som binder IgG Fc. Dessa försök utfördes exakt såsom beskrivits ovan för identifiering av *E. coli*-kolonier som uttryckte Ig lättkedjebindande protein förutom att radioaktivt märkt (^{125}I) IgG Fc (20 ng/ml) användes som sond. Kloner som reagerade med båda proteinerna utvaldes och analyserades med avseende på storlek på det i vektorn introducerade DNA-

-fragment t. av dessa kloner utvald för produktion av protein LG, PHDLG. Det i plasmid pHD389 introducerade DNA:t från denna klon sekvenserades. DNA-sekvensen uppvägsad full överensstämmelse med motsvarande sekvens (B1-B4 samt 21 baser i B5) i genen för protein L från *Peptostreptococcus magnus*, strain 312 samt med ClDC2 sekvensen i grupp C streptokockstam C40. Storlek och bindningsegenskaper hos det protein som producerades av klon PHDLG analyserades med hjälp av SDS-PAGE (se fig. 9), dot-blotexperiment (se fig. 10) och kompetitiva bindningsexperiment.

Produktion av protein LG

Flera kolonier från en odlingsplatta med *E. coli* PHDLG användes för att inokulera en förkultur (LB-medium med tillsats av 100 mg/l ampicillin) som odlas vid 28°C över natt. Förkulturen överfördes på morgonen till en större volym (100 x volymen av förkulturen) färskt LB-medium med ampicillin (100 mg/l) och odlades i skakkolv (200 rpm), (eller fermentor) vid 28°C. Då absorbansvärdet vid 620 nm nått 0,5, höjdes odlingstemperaturen till 40°C (induktion av transkription). Odlingen pågick därefter under 4 timmar (gäller endast odling i skakkolv). Då odlingen avslutats centrifugerades bakteriererna ner. Bakterierna lyserades därefter med en osmotisk chockmetod vid 4°C (Dalbøge et al., 1989), pH i lysatet ställdes till 7. Kvarvarande bakterierester centrifugerades ner varefter supernatanten renades på IgG-sepharose enligt tidigare för protein G och protein L beskrivna protokoll. (Sjöbring et al., 1991, Kastern et al., 1992).

Expressionssystemet gav ca 30 mg/l av protein LG vid odling i skakkolv. Deposition har gjorts vid DSSM, Identification Reference DSSM *E. coli* LE392/pHDLG.

Exempel 3**Analys av bindningsegenskaperna hos prot in LG****Western Blot**

5

10

15

Protein G (C1DC2-frAGMENTET), protein L (fyra B-domäner) samt protein LG separerades med SDS-PAGE (10% akrylamid-koncentration). Efter separation överfördes proteinerna till nitrocellulosamembran i tre likadana kopior. Var och en av dessa membran inkuberades med radioaktivt märkta proteiner (20 ng/ml: en av membran-kopiorna inkuberades med humant polyklonalt IgG, en annan med humana IgG Fc-fragment och den tredje med isolerade humana IgG α -kedjor. Ej inbundna radioaktivt märkta proteiner sköljdes av, varefter samtliga filter exponerades för röntgenfilm.

Slot-blot

20

25

Humana polyklonala Ig-preparationer och Ig-fragment applicerades med hjälp av en slot-blot utrustning på nitrocellulosa-filter i angivna mängder (se fig. 10) på tre likadana kopior. Var och en av dessa membraner inkuberades med radioaktivt märkta proteiner (20 ng/ml). En av membrankopiorna inkuberades med protein LG, en annan med protein L och den tredje med protein G. Ej inbundna radioaktivt märkta proteiner sköljdes av, varefter samtliga filter exponerades för röntgenfilm.

Resultaten framgår av Fig. 9 och 10.

30

Även andra bindningsundersökningar har utförts med följande resultat:

TABELL

Bindning av prot in rna G, L och LG till Immunglobuliner.

Bindande prot in:	G	K _a	L	K _a	LG	K _a
Immunglobulin						
Humana:						
Folyklonalt IgG*	+	67 (10)	+	9.0	+	20
IgG subklass r						
IgG ₁	+	2.0	+		+	
IgG ₂	+	3.1	+		+	
IgG ₃	+	6.1	+		+	
IgG ₄	+	4.7	+		+	
IgG fragment						
Fc*	+	6.0 (0.5)	-		+	
F(ab') ₂ *	+	0.4 (0.2)	+		+	
kappa	-		+	1.5	+	
lambda	-		(-)*			
Andra Ig-klasser						
IgM	-		+	11.6	+	
IgA	-		+	10.4	+	
IgE	-		+		+	
IgD	-					
Andra Species:						
Polyklonalt						
Apa	+		+		+	
Kanin						
IgG	+	70	+	0.074	+	
IgG-Fc	+	3.0	-		+	
IgG-F(ab') ₂	+	0.44			+	
Mus	+	41	+	2.6	+	
Råtta	+	1.5	+	0.39	+	
Get	+	14	-		+	
Bovint						
IgG ₁	+	3	-		+	
IgG ₂	+	2	-		+	
Häst	+		-		+	
Marsvin	+		+		+	
Får	+		-		+	
Hund	+		-		+	
Svin	+		+		+	
Hamster	+					
Katt	-		-			
Hons	-		-			
Monoklonaler[§]						
Mus						
IgG ₁	+		+		+	
IgG _{2a}	+		+		+	
IgG _{2b}	+				+	
IgG ₃	+				+	
IgM	-		+		+	
IgA	-		+		+	
Råtta						
IgG _{2a}	+		+		+	
IgG _{2b}	+				+	
IgG _{2c}	+				+	

K_a -affinitetskonstant (M⁻¹). * Siffrorna inom parant s ang r affinit t n for ett rekombinant pr t in G som b står av två IgG-bindand domäner. § En svag binding till lambda kedj r xist rar.
[§] Binding till PL o PLG b ror av typ av lätt kedja hos Ig.

Det framgår sålunda att det synt tis rad hy idprot inet LG
har en bred bindningsaktivitet/specificit t.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10

Patentkrav

1. Protein L vilket har förmåga att binda till de lätta
k djorna av immunglobuliner, k ä n n e t e c k n a t av
att det har följand aminosyrasekvens

5

— B1

Ala Val Glu Asn Lys Glu Glu Thr Pro Glu Thr Pro Glu Thr Asp Ser
1 5 10 15

Glu Glu Glu Val Thr Ile Lys Ala Asn Leu Ile Phe Ala Asn Gly Ser
20 25 30

10

Thr Gln Thr Ala Glu Phe Lys Gly Thr Phe Glu Lys Ala Thr Ser Glu
35 40 45

Ala Tyr Ala Tyr Ala Asp Thr Leu Lys Lys Asp Asn Gly Glu Tyr Thr
50 55 60

15

Val Asp Val Ala Asp Lys Gly Tyr Thr Leu Asn Ile Lys Phe Ala Gly
65 70 75 80

Lys Glu Lys Thr Pro Glu Glu Pro Lys Glu Glu Val Thr Ile Lys Ala
85 90 95

20

Asn Leu Ile Tyr Ala Asp Gly Lys Thr Gln Thr Ala Glu Phe Lys Gly
100 105 110

Thr Phe Glu Glu Ala Thr Ala Glu Ala Tyr Arg Tyr Ala Asp Ala Leu
115 120 125

Lys Lys Asp Asn Gly Glu Tyr Thr Val Asp Val Ala Asp Lys Gly Tyr
130 135 140

25

— B3

Thr Leu Asn Ile Lys Phe Ala Gly Lys Glu Lys Thr Pro Glu Glu Pr
145 150 155 160

Lys Glu Glu Val Thr Ile Lys Ala Asn Leu Ile Tyr Ala Asp Gly Lys
165 170 175

30

Thr Gln Thr Ala Glu Phe Lys Gly Thr Phe Glu Glu Ala Thr Ala Glu
180 185 190

Ala Tyr Arg Tyr Ala Asp Leu Leu Ala Lys Glu Asn Gly Lys Tyr Thr
195 200 205

Val Asp Val Ala Asp Lys Gly Tyr Thr Leu Asn Ile Lys Phe Ala Gly
210 215 220

B4

29

Lys Glu Lys Thr **Asp** Glu Glu Pro Lys Glu Glu Val Thr Ile Lys Ala
 225 230 235 240

Asn Leu Il Tyr Ala Asp Gly Lys Thr Gln Thr Ala Glu Ph Ly Gly
 245 250 255

5 Thr Ph Ala Glu Ala Thr Ala Glu Ala Tyr Arg Tyr Ala Asp Leu Leu
 260 265 270

Ala Lys Glu Asn Gly Lys Tyr Thr Ala Asp Leu Glu Asp Gly Gly Tyr
 275 280 — B5 285

10 Thr Ile Asn Ile Arg Phe Ala Gly Lys Lys Val Asp Glu Lys Pro Glu
 290 295 300

Glu

15

20 och varianter, subfragment, multipler eller blandningar av
 domänerna B1-B5 med samma bindningsegenskaper.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10

2. DNA-sekvens, k ä n n t e c k n a d av att d n kodar
för prot inet enligt krav 1 och har följande nukleotidsekvens

Protein L domän I-IV DNA-sekvens

GCG GTA GAA AAT AAA GAA GAA ACA CCA GAA ACA CCA GAA ACT GAT TCA	48
GAA GAA GAA GTA ACA ATC AAA GCT AAC CTA ATC TTT GCA AAT GGA AGC	96
ACA CAA ACT GCA GAA TTC AAA GGA ACA TTT GAA AAA GCA ACA TCA GAA	144
GCT TAT GCG TAT GCA GAT ACT TTG AAG AAA GAC AAT GGA GAA TAT ACT	192
GTA GAT GTT GCA GAT AAA GGT TAT ACT TTA AAT ATT AAA TTT GCT GGA	240
AAA GAA AAA ACA CCA GAA GAA CCA AAA GAA GAA GTT ACT ATT AAA GCA	288
AAC TTA ATC TAT GCA GAT GGA AAA ACA CAA ACA GCA GAA TTC AAA GGA	336
ACA TTT GAA GAA GCA ACA GCA GAA GCA TAC AGA TAT GCA GAT GCA TTA	384
AAG AAG GAC AAT GGA GAA TAT ACA GTA GAC GTT GCA GAT AAA GGT TAT	432
ACT TTA AAT ATT AAA TTT GCT GGA AAA GAA AAA ACA CCA GAA GAA CCA	480
AAA GAA GAA GTT ACT ATT AAA GCA AAC TTA ATC TAT GCA GAT GGA AAA	528
ACA CAA ACA GCA GAA TTC AAA GGA ACA TTT GAA GAA GCA ACA GCA GAA	576
GCA TAC AGA TAT GCT GAC TTA TTA GCA AAA GAA AAT GGT AAA TAT ACA	624
GTA GAC GTT GCA CAT AAA GGT TAT ACT TTA AAT ATT AAA TTT GCT GGA	672
AAA GAA AAA ACA CCA GAA GAA CCA AAA GAA GAA GTT ACT ATT AAA GCA	720
AAC TTA ATC TAT GCA GAT GGA AAA ACT CAA ACA GCA GAG TTC AAA GGA	768
ACA TTT GCA GAA GCA ACA GCA GAA GCA TAC AGA TAC GCT GAC TTA TTA	816
GCA AAA GAA AAT GGT AAA TAT ACA GCA GAC TTA GAA GAT GGT GGA TAC	864
ACT ATT AAT ATT AGA TTT GCA GGT AAG AAA GTT GAC GAA AAA CCA GAA	912
GAA TAATAA	921

3. Hybridprotein k ä n n e t e c k n a t att d e t inne-
håll r n l l r f l r a av B1-B5-domän rna enligt krav 1, som
bind r till de lätta kedjorna i immunglobulin r av alla
kla s r, samt domäner som bind r till tunga kedjor i immu-
globulin G.

4. Hybridprotein enligt krav 3, k ä n n e t e c k n a t av
att de domäner som binder till tunga kedjor i immunglobulin G
väljs bland C1- och C2-domänerna i protein G eller vilket som
helst av andra funktionellt likartade proteiner vilka binder
till tunga kedjor i immunglobulin G, samt varianter, sub-
fragment, multipler eller blandningar därav med samma
bindningsegenskaper.

5. Hybridprotein enligt krav 4, k ä n n e t e c k n a t av
att det har följande aminosyrasekvens

Protein 13 - Aminoacids

Ala	Val	Glu	Asn	Lys	Glu	Glu	Thr	Pro	Glu	Thr	Pro	Glu	Thr	Asp	Ser	5	10	15
Glu	Glu	Glu	Val	Thr	Ile	Lys	Ala	Asn	Leu	Ile	Phe	Ala	Asn	Gly	Ser	20	25	30
Thr	Gln	Thr	Ala	Glu	Phe	Lys	Gly	Thr	Phe	Glu	Lys	Ala	Thr	Ser	Glu	35	40	45
Ala	Tyr	Ala	Tyr	Ala	Asp	Thr	Leu	Lys	Lys	Asp	Asn	Gly	Glu	Tyr	Thr	50	55	60
Val	Asp	Val	Ala	Asp	Lys	Gly	Tyr	Thr	Leu	Asn	Ile	Lys	Phe	Ala	Gly	65	70	75
Lys	Glu	Lys	Thr	Pro	Glu	Glu	Pro	Lys	Glu	Glu	Val	Thr	Ile	Lys	Ala	85	90	95
Asn	Leu	Ile	Tyr	Ala	Asp	Gly	Lys	Thr	Gln	Thr	Ala	Glu	Phe	Lys	Gly	100	105	110
Thr	Phe	Glu	Glu	Ala	Thr	Ala	Glu	Ala	Tyr	Arg	Tyr	Ala	Asp	Ala	Leu	115	120	125
Lys	Lys	Asp	Asn	Gly	Glu	Tyr	Thr	Val	Asp	Val	Ala	Asp	Lys	Gly	Tyr	130	135	140
Thr	Leu	Asn	Ile	Lys	Phe	Ala	Gly	Lys	Glu	Lys	Thr	Pro	Glu	Glu	Pro	145	150	155
Lys	Glu	Glu	Val	Thr	Ile	Lys	Ala	Asn	Leu	Ile	Tyr	Ala	Asp	Gly	Lys	165	170	175
Thr	Gln	Thr	Ala	Glu	Phe	Lys	Gly	Thr	Phe	Glu	Glu	Ala	Thr	Ala	Glu	180	185	190
Ala	Tyr	Arg	Tyr	Ala	Asp	Leu	Leu	Ala	Lys	Glu	Asn	Gly	Lys	Tyr	Thr	195	200	205
Val	Asp	Val	Ala	Asp	Lys	Gly	Tyr	Thr	Leu	Asn	Ile	Lys	Phe	Ala	Gly	210	215	220
Lys	Glu	Lys	Thr	Pro	Glu	Glu	Pro	Lys	Glu	Glu	Val	Thr	Ile	Lys	Ala	225	230	235
Asn	Leu	Ile	Tyr	Ala	Asp	Gly	Lys	Thr	Gln	Thr	Ala	Glu	Phe	Lys	Gly	245	250	255
Thr	Ph	Ala	Glu	Ala	Thr	Ala	Glu	Ala	Tyr	Arg	Tyr	Ala	Asp	Leu	Leu	260	265	270
Ala	Lys	Glu	Asn	Gly	Lys	Tyr	Thr	Ala	Asp	Leu	Glu	Asp	Gly	Gly	Tyr	275	280	285
Thr	Ile	Asn	Ile	Arg	Phe	Ala	Gly	Lys	Lys	Val	Asp	Glu	Lys	Pro	Glu	290	295	300

310 Pro Met Asp Thr Tyr Lys Leu Ile Leu Asn Gly Lys Thr Leu Lys
 305 310 315 320

Gly Glu Thr Thr Thr Glu Ala Val Asp Ala Ala Thr Ala Glu Lys Val
 325 330 335

Phe Lys Gln Tyr Ala Asn Asp Asn Gly Val Asp Gly Glu Trp Thr Tyr
 340 345 350

Asp Asp Ala Thr Lys Thr Phe Thr Val Thr Glu Lys Pro Glu Val Ile
 355 360 365

10 Asp Ala Ser Glu Leu Thr Pro Ala Val Thr Thr Tyr Lys Leu Val Ile
 370 375 380

Asn Gly Lys Thr Leu Lys Gly Glu Thr Thr Thr Lys Ala Val Asp Ala
 385 390 395 400

15 Glu Thr Ala Glu Lys Ala Phe Lys Gln Tyr Ala Asn Asp Asn Gly Val
 405 410 415

Asp Gly Val Trp Thr Tyr Asp Asp Ala Thr Lys Thr Phe Thr Val Thr
 420 425 430

Glu Met

20

och varianter, subfragment, multipler eller blandningar av
 domänerna B1-B5 med samma bindningsegenskaper.

25 6. DNA-sekvens, k ä n n e t e c k n a d av att den kodar
 för ett protein enligt krav 5 och har följande nukleotid-
 sekvens

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65
66
67
68
69
70
71
72
73
74
75
76
77
78
79
80
81
82
83
84
85
86
87
88
89
90
91
92
93
94
95
96
97
98
99
100

IG DNA-SEKVENES

PEV 90.04.29

GCG GTA GAA AAT AAA GAA GAA ACA CCA GAA ACA CCA GAA ACT GAT TCA	
GAA GAA GAA GTA ACA ATC AAA GCT AAC CTA ATC TTT GCA AAT GGA AGC	26
ACA CAA ACT GCA GAA TTC AAA GGA ACA TTT GAA AAA GCA ACA TCA GAA	72
GCT TAT GCG TAT GCA GAT ACT TTG AAG AAA GAC AAT GGA GAA TAT ACT	122
GTA GAT GTT GCA GAT AAA GGT TAT ACT TTA AAT ATT AAA TTT GCT GGA	240
AAA GAA AAA ACA CCA GAA GAA CCA AAA GAA GAA GTT ACT ATT AAA GCA	288
AAC TTA ATC TAT GCA GAT GGA AAA ACA CAA ACA GCA GAA TTC AAA GGA	336
ACA TTT GAA GAA GCA ACA GCA GAA GCA TAC AGA TAT GCA GAT GCA TTA	384
AAG AAG GAC AAT GGA GAA TAT ACA GTA GAC GTT GCA GAT AAA GGT TAT	432
ACT TTA AAT ATT AAA TTT GCT GGA AAA GAA AAA ACA CCA GAA GAA CCA	480
AAA GAA GAA GTT ACT ATT AAA GCA AAC TTA ATC TAT GCA GAT GGA AAA	528
ACA CAA ACA GCA GAA TTC AAA GGA ACA TTT GAA GAA GCA ACA GCA GAA	576
GCA TAC AGA TAT GCT GAC TTA TTA GCA AAA GAA AAT GGT AAA TAT ACA	624
GTA GAC GTT GCA GAT AAA GGT TAT ACT TTA AAT ATT AAA TTT GCT GGA	672
AAA GAA AAA ACA CCA GAA GAA CCA AAA GAA GAA GTT ACT ATT AAA GCA	720
AAC TTA ATC TAT GCA GAT GGA AAA ACT CAA ACA GCA GAG TTC AAA GGA	768
ACA TTT GCA GAA GCA ACA GCA GAA GCA TAC AGA TAC GCT GAC TTA TTA	816
GCA AAA GAA AAT GGT AAA TAT ACA GCA GAC TTA GAA GAT GGT GGA TAC	864
ACT ATT AAT ATT AGA TTT GCA GGT AAG AAA GTT GAC GAA AAA CCA GAA	912
GAA CCC ATG GAC ACT TAC AAA TTA ATC CTT AAT GGT AAA ACA TTG AAA	960
GGC GAA ACA ACT ACT GAA GCT GTT GAT GCT GCT ACT GCA GAA AAA GTC	1008
TTC AAA CAA TAC GCT AAC GAC AAC GGT GTT GAC GGT GAA TGG ACT TAC	1056
GAC GAT GCG ACT AAG ACC TTT ACA GTT ACT GAA AAA CCA GAA GTG ATC	1104
GAT GCG TCT GAA TTA ACA CCA GCC GTG ACA ACT TAC AAA CTT GTT ATT	1152
AAT GGT AAA ACA TTG AAA GGC GAA ACA ACT ACT AAA GCA GTA GAC GCA	1200
GAA ACT GCA GAA AAA GCC TTC AAA CAA TAC GCT AAC GAC AAC GGT GTT	1248
GAT GGT GTT TGG ACT TAT GAT GAT GCG ACT AAG ACC TTT ACG GTA ACT	1296
GAA ATG TAATAA	1308

7. DNA-sekvens, k ä n n e t e c k n a d av att den kodar för ett protein enligt krav 3 och 4.

5 8. DNA-sekvens, k ä n n e t e c k n a d av att den hybridiserar till DNA-sekvens i krav 2, 6 eller 7 under konventionella betingelser och kodar för ett protein, som har samma bindningsegenskaper som proteinen enligt något av kraven 1 och 3-5.

10 9. Plasmidvektor, k ä n n e t e c k n a d av att den innehåller en DNA-sekvens enligt något av kraven 2 och 6-8, företrädesvis vektorn pHDLG eller pHDL.

10 10. Värddcell, k ä n n e t e c k n a d av att den är transformerad med hybridplasmiden enligt krav 9, i synnerhet en värd som hör till arten *E. coli*, speciellt *E. coli* LE 392, eller *Bacillus subtilis*, *Saccharomyces cerevisiae*, företrädesvis Id. Ref. DSSM *E. coli* LE392 pHDL resp. *E. coli* LE392/pHDLG.

20 11. Förfarande för framställning av ett protein enligt krav 1 och 3-5, k ä n n e t e c k n a t av att man odlar en värdcell enligt krav 10 under lämpliga betingelser, ackumulerar proteinet i kulturen eller lyserar cellerna och utvinnet därifrån.

25 12. En reagensutrustning för bindning, separation och identifiering av immunglobuliner, k ä n n e t e c k n a d av att den innehåller ett protein enligt något av kraven 1, 3-5.

30 13. En komposition, k ä n n e t e c k n a d av att den innehåller ett protein enligt något av kraven 1 och 3-5, och eventuellt tillsatser eller bärare.

35 14. En farmaceutisk komposition, k ä n n e t e c k n a d av att den innehåller ett protein enligt något av kraven 1 och 3-5, och eventuellt farmaceutiskt godtagbara bärare eller utdrygningsmedel.

Uppfinning n av s kvens r av prot in L, s m binder till lätta kedjor av immunglobuliner. Uppfinningen avser även hybridproteiner därav, vilka hybridpr teiner kan binda till både lätta och tunga kedjor av immunglobulin G, i synnerhet protein LG. Vidare avser uppfinningen DNA-sekvenser som kodar för proteinerna, vektorer innehållande sådana DNA-sekvenser, värdceller transformerade med vektorerna, förfaranden för framställning av proteinerna, reagensutrustning för separation och identifikation av immunglobuliner, kompositioner samt farmaceutiska kompositioner, som innehåller proteinerna.

Protein L - DNA och Aminosyror

GCG	GTA	GAA	AAT	AAA	GAA	GAA	ACA	CCA	GAA	ACA	CCA	GAA	ACT	GAT	TCA	
Ala	Val	Glu	Asn	Lys	Glu	Glu	Thr	Pro	Glu	Thr	Pro	Glu	Thr	Asp	Ser	
1				5					10					15		
GAA	GAA	GAA	GTA	ACA	ATC	AAA	GCT	AAC	CTA	ATC	TTT	GCA	AAT	GGA	AGC	
Glu	Glu	Glu	Val	Thr	Ile	Lys	Ala	Asn	Leu	Ile	Phe	Ala	Asn	Gly	Ser	
			20					25					30			
ACA	CAA	ACT	GCA	GAA	TTC	AAA	GGA	ACA	TTT	GAA	AAA	GCA	ACA	TCA	GAA	
Thr	Gln	Thr	Ala	Glu	Phe	Lys	Gly	Thr	Phe	Glu	Lys	Ala	Thr	Ser	Glu	
		35					40					45				141
GCT	TAT	GCG	TAT	GCA	GAT	ACT	TTG	AAG	AAA	GAC	AAT	GGA	GAA	TAT	ACT	
Ala	Tyr	Ala	Tyr	Ala	Asp	Thr	Leu	Lys	Lys	Asp	Asn	Gly	Glu	Tyr	Thr	
	50					55					60					172
GTA	GAT	GTT	GCA	GAT	AAA	GGT	TAT	ACT	TTA	AAT	ATT	AAA	TTT	GCT	GGA	
Val	Asp	Val	Ala	Asp	Lys	Gly	Tyr	Thr	Leu	Asn	Ile	Lys	Phe	Ala	Gly	
65					70					75				80		240
AAA	GAA	AAA	ACA	CCA	GAA	GAA	CCA	AAA	GAA	GAA	GTT	ACT	ATT	AAA	GCA	
Lys	Glu	Lys	Thr	Pro	Glu	Glu	Pro	Lys	Glu	Glu	Val	Thr	Ile	Lys	Ala	
			85						90					95		280
AAC	TTA	ATC	TAT	GCA	GAT	GGA	AAA	ACA	CAA	ACA	GCA	GAA	TTC	AAA	GGA	
Asn	Leu	Ile	Tyr	Ala	Asp	Gly	Lys	Thr	Gln	Thr	Ala	Glu	Phe	Lys	Gly	
			100					105					110			316
ACA	TTT	GAA	GAA	GCA	ACA	GCA	GAA	GCA	TAC	AGA	TAT	GCA	GAT	GCA	TTA	
Thr	Phe	Glu	Glu	Ala	Thr	Ala	Glu	Ala	Tyr	Arg	Tyr	Ala	Asp	Ala	Leu	
		115					120					125				384
AAG	AAG	GAC	AAT	GGA	GAA	TAT	ACA	GTA	GAC	GTT	GCA	GAT	AAA	GGT	TAT	
Lys	Lys	Asp	Asn	Gly	Glu	Tyr	Thr	Val	Asp	Val	Ala	Asp	Lys	Gly	Tyr	
	130					135					140					412
ACT	TTA	AAT	ATT	AAA	TTT	GCT	GGA	AAA	GAA	AAA	ACA	CCA	GAA	GAA	CCA	
Thr	Leu	Asn	Ile	Lys	Phe	Ala	Gly	Lys	Glu	Lys	Thr	Pro	Glu	Glu	Pro	
145					150					155					160	480
AAA	GAA	GAA	GTT	ACT	ATT	AAA	GCA	AAC	TTA	ATC	TAT	GCA	GAT	GGA	AAA	
Lys	Glu	Glu	Val	Thr	Ile	Lys	Ala	Asn	Leu	Ile	Tyr	Ala	Asp	Gly	Lys	
				165					170					175		528
ACA	CAA	ACA	GCA	GAA	TTC	AAA	GGA	ACA	TTT	GAA	GAA	GCA	ACA	GCA	GAA	
Thr	Gln	Thr	Ala	Glu	Phe	Lys	Gly	Thr	Phe	Glu	Glu	Ala	Thr	Ala	Glu	
			180					185					190			576
GCA	TAC	AGA	TAT	GCT	GAC	TTA	TTA	GCA	AAA	GAA	AAT	GGT	AAA	TAT	ACA	
Ala	Tyr	Arg	Tyr	Ala	Asp	Leu	Leu	Ala	Lys	Glu	Asn	Gly	Lys	Tyr	Thr	
		195				200						205				624
GTA	GAC	GTT	GCA	GAT	AAA	GGT	TAT	ACT	TTA	AAT	ATT	AAA	TTT	GCT	GGA	
Val	Asp	Val	Ala	Asp	Lys	Gly	Tyr	Thr	Leu	Asn	Ile	Lys	Ph	Ala	Gly	
	210					215					220					672

AAA	GAA	AAA	ACA	CCA	GAA	GAA	CCA	AAA	GAA	GAA	GTT	ACT	ATT	AAA	GCA	820
Lys	Glu	Lys	Thr	Pro	Glu	Glu	Pro	Lys	Glu	Glu	Val	Thr	Ile	Lys	Ala	
225					230					235					240	
AAC	TTA	ATC	TAT	GCA	GAT	GGA	AAA	ACT	CAA	ACA	GCA	GAG	TTC	AAA	GGA	768
Asn	Leu	Ile	Tyr	Ala	Asp	Gly	Lys	Thr	Gln	Thr	Ala	Glu	Phe	Lys	Gly	
				245				250						255		
ACA	TTT	GCA	GAA	GCA	ACA	GCA	GAA	GCA	TAC	AGA	TAC	GCT	GAC	TTA	TTA	816
Thr	Phe	Ala	Glu	Ala	Thr	Ala	Glu	Ala	Tyr	Arg	Tyr	Ala	Asp	Leu	Leu	
			260				265						270			
GCA	AAA	GAA	AAT	GGT	AAA	TAT	ACA	GCA	GAC	TTA	GAA	GAT	GGT	GGA	TAC	864
Ala	Lys	Glu	Asn	Gly	Lys	Tyr	Thr	Ala	Asp	Leu	Glu	Asp	Gly	Gly	Tyr	
		275				280						285				
ACT	ATT	AAT	ATT	AGA	TTT	GCA	GGT	AAG	AAA	GTT	GAC	GAA	AAA	CCA	GAA	912
Thr	Ile	Asn	Ile	Arg	Phe	Ala	Gly	Lys	Lys	Val	Asp	Glu	Lys	Pro	Glu	
	290					295					300					
GAA	TAA	TAA														921
Glu																
305																

1
 2
 3
 4
 5
 6
 7
 8
 9
 10

3406

AAGCTTAAGGAGGTTAATCG ATG AAA AAA ACT GCT ATC GCT ATC GCT GTT

H A C met

1 f RBS

n 1 a

3 2 1

GCT CTG GCT GGT TTC GCT ACT GTT GCT CAG GCG GCG CCG AGA TCT

aia N

B

a

0

r

1

1

2

t

S

b

a

a

1

i

1

AAA CAG GAA TTC CAG CTC GGT ACC CCG GCA TCC TCT AGA GTC GAC

E

S

K

X

B

X

S

C

a

p

m

a

b

a

O

C

h

a

m

a

1

I

1

1

1

1

1

1

CTG CAG GCA TGC

P

S

1

S

p

h

t

1

1

3557

c1857

RBS

7 MÅLEDTIDER

EcoRI

NarI

MULTIPEL KLONINGSSEKVEN

NarI SphI

SphI

FÖR ÖBERGÖENDE
TRANSCRIPTIONS
AVSLUTANDE
SEKVEN

SIGNALPEPTID FOR SEKVEN
FRAN ompA

MULTIPEL KLONINGSSEKVEN

RBS = RIBOSOMAL
BINDINGSSEKVEN

PR "HOGRA" FRÅN E. COLI

c1857 GENE FÖR ETT VÄRMKÄNLIKT
REPRESSOR-PROTEIN FRÅN
E. COLI

NarI

BulI

EcoRI

SacI

KpnI

XmaI

BamHI

XbaI

SalI

PstI

SphI

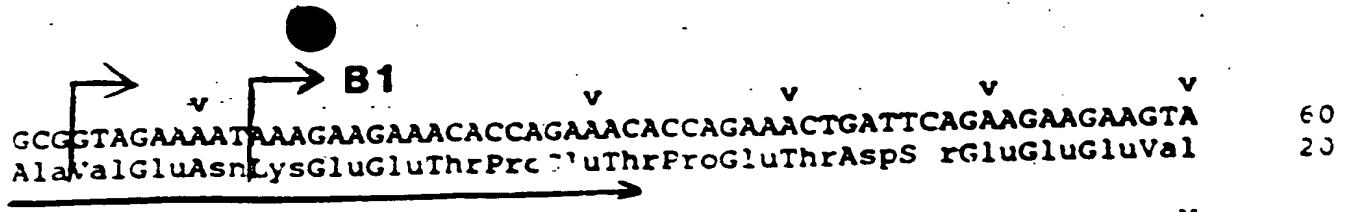
UNIKA
KLYVNINGS-
STÄLLER

FIG.2

PLASMIDEN pHD 389. DEN RIBOSOMALA BINDINGS-
SEKVEN (UNDERSTRUKEN MED HJÄLDRAGEN LINJE).
SEKVEN FÖR SIGNALPEPTIDEN FRÅN ompA (FRÅN E.coli) (PRICKAD) SAMT
IGENKÄNNINGSSEKVEN FÖR FLERA RESTRIKTIONSENZYMER VISAS.

PROTEIN LG

PRV 92.04.28



GCGGTAGAAAATAAAGAAGAAACACCAGAAACACCAGAACTGATTTCAGAAGAAGAAGTA 60
 AlaValGluAsnLysGluGluThrProGluThrProGluThrAspS rGluGluGluVal 20

ACAATCAAAGCTAACCTAATCTTTGCAAATGGAAGCACACAACTGCAGAATTCAAAGGA 120
 ThrIleLysAlaAsnLeuIlePheAlaAsnGlySerThrGlnThrAlaGluPheLysGly 40

ACATTTGAAAAAGCAACATCAGAAGCTTATGCGTATGCAGATACTTTGAAGAAAGACAAT 180
 ThrPheGluLysAlaThrSerGluAlaTyrAlaTyrAlaAspThrLeuLysLysAspAsn 60

GGAGAATATACTGTAGATGTTGCAGATAAAGGTTATACTTTAAATATTAAATTTGCTGGA 240
 GlyGluTyrThrValAspValAlaAspLysGlyTyrThrLeuAsnIleLysPheAlaGly 80

AAAGAAAAACACCAGAAGAACCAAAGAAGGTTACTATTAAAGCAAACCTTAATCTAT 300
 LysGluLysThrProGluGluProLysGluGluValThrIleLysAlaAsnLeuIleTyr 100

GCAGATGGAAAAACACAAACAGCAGAATTCAAAGGAACATTTGAAGAAGCAACAGCAGAA 360
 AlaAspGlyLysThrGlnThrAlaGluPheLysGlyThrPheGluGluAlaThrAlaGlu 120

GCATACAGATATGCAGATGCAATTAAAGAAGGACAATGGAGAATATACAGTAGACGTTGCA 420
 AlaTyrArgTyrAlaAspAlaLeuLysLysAspAsnGlyGluTyrThrValAspValAla 140

GATAAAGGTTATACTTTAAATATTAAATTTGCTGGAAAAAGAAAAACACCAGAAGAACCA 480
 AspLysGlyTyrThrLeuAsnIleLysPheAlaGlyLysGluLysThrProGluGluPro 160

AAAGAAGAAGTTACTATTAAAGCAAACCTTAATCTATGCAGATGGAAAAACACAAACAGCA 540
 LysGluGluValThrIleLysAlaAsnLeuIleTyrAlaAspGlyLysThrGlnThrAla 180

GAATTCAAAGGAACATTTGAAGAAGCAACAGCAGAAGCATAACAGATATGCTGACTTATTA 600
 GluPheLysGlyThrPheGluGluAlaThrAlaGluAlaTyrArgTyrAlaAspLeuLeu 200

GCAAAGAAAAATGGTAAATATACAGTAGACGTTGCAGATAAAGGTTATACTTTAAATATT 660
 AlaLysGluAsnGlyLysTyrThrValAspValAlaAspLysGlyTyrThrLeuAsnIle 220

AAATTTGCTGGAAAAAGAAAAACACCAGAAGAACCAAAGAAGGTTACTATTAAAGCA 720
 LysPheAlaGlyLysGluLysThrProGluGluProLysGluGluValThrIleLysAla 240

AACTTAATCTATGCAGATGGAAAACTCAAACAGCAGAGTTCAAAGGAACATTTGCAGAA 780
 AsnLeuIleTyrAlaAspGlyLysThrGlnThrAlaGluPheLysGlyThrPh AlaGlu 260

GCAACAGCAGAAGCATAACGCTGACTTATTAGCAAAAGAAAATGGTAAATATACA 840
 AlaThrAlaGluAlaTyrArgTyrAlaAspLeuLeuAlaLysGluAsnGlyLysTyrThr 280
 GCAGACTTAGAAGATGGTGGATACACTATTAATATTAGATTGTCAGGTAAGAAAGTTGAC 900
 AlaAspLeuGluAspGlyGlyTyrThrIleAsnIleArgPheAlaGlyLysLysValAsp 300
 GAAAAACCAGAAGAACCCATGGACACTTACAAATTAATCCTTAATGGTAAACATTGAAA 960
 GluLysProGluGluProMetAspThrTyrLysLeuIleLeuAsnGlyLysThrLeuLys 320
 GGCGAAACAACACTACTGAAGCTGTTGATGCTGCTACTGCAGAAAAAGTCTTCAAA CAATAC 1020
 GlyGluThrThrThrGluAlaValAspAlaAlaThrAlaGluLysValPheLysGlnTyr 340
 GCTAACGACAACGGTGTGACGGTGAATGGACTTACGACGATGCGACTAAGACCTTTACA 1080
 AlaAsnAspAsnGlyValAspGlyGluTrpThrTyrAspAspAlaThrLysThrPheThr 360
 GTTACTGAAAAACCAGAAGTGATCGATGCGTCTGAATTAACACCAGCCGTGACAACTTAC 1140
 ValThrGluLysProGluValIleAspAlaSerGluLeuThrProAlaValThrThrTyr 380
 AAACCTTGTTATTAATGGTAAACATTGAAAGGCGAAACAACACTACTAAAGCAGTAGACGCA 1200
 LysLeuValIleAsnGlyLysThrLeuLysGlyGluThrThrThrLysAlaValAspAla 400
 GAAACTGCAGAAAAAGCCTTCAAACAATACGCTAACGACAACGGTGTGATGGTGTGTTGG 1260
 GluThrAlaGluLysAlaPheLysGlnTyrAlaAsnAspAsnGlyValAspGlyValTrp 420
 ACTTATGATGATGCGACTAAGACCTTTACGGTAACTGAAATGTAATAA 1308
 ThrTyrAspAspAlaThrLysThrPheThrValThrGluMet - - 434

FIG. 4 SCHEMATISK ÖVERSIKT FÖR FRAMSTÄLLNING AV PROTEIN L

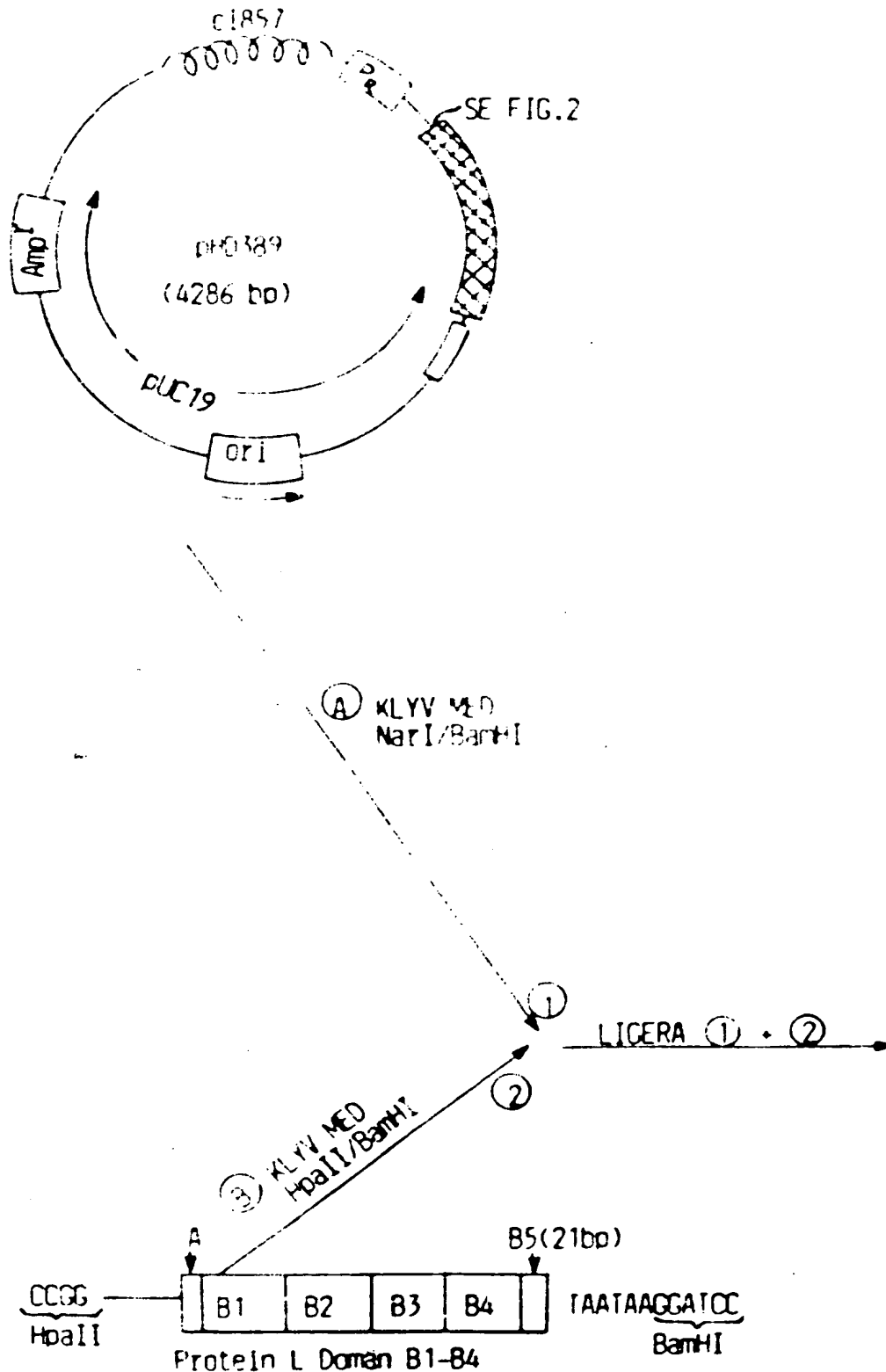


FIG. 4(1)

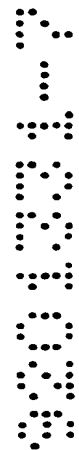


FIG.4(2)

FIG.5 SCHEMATISK OVERSIKT FOR FRAMSTALLNING AV PROTEIN LG

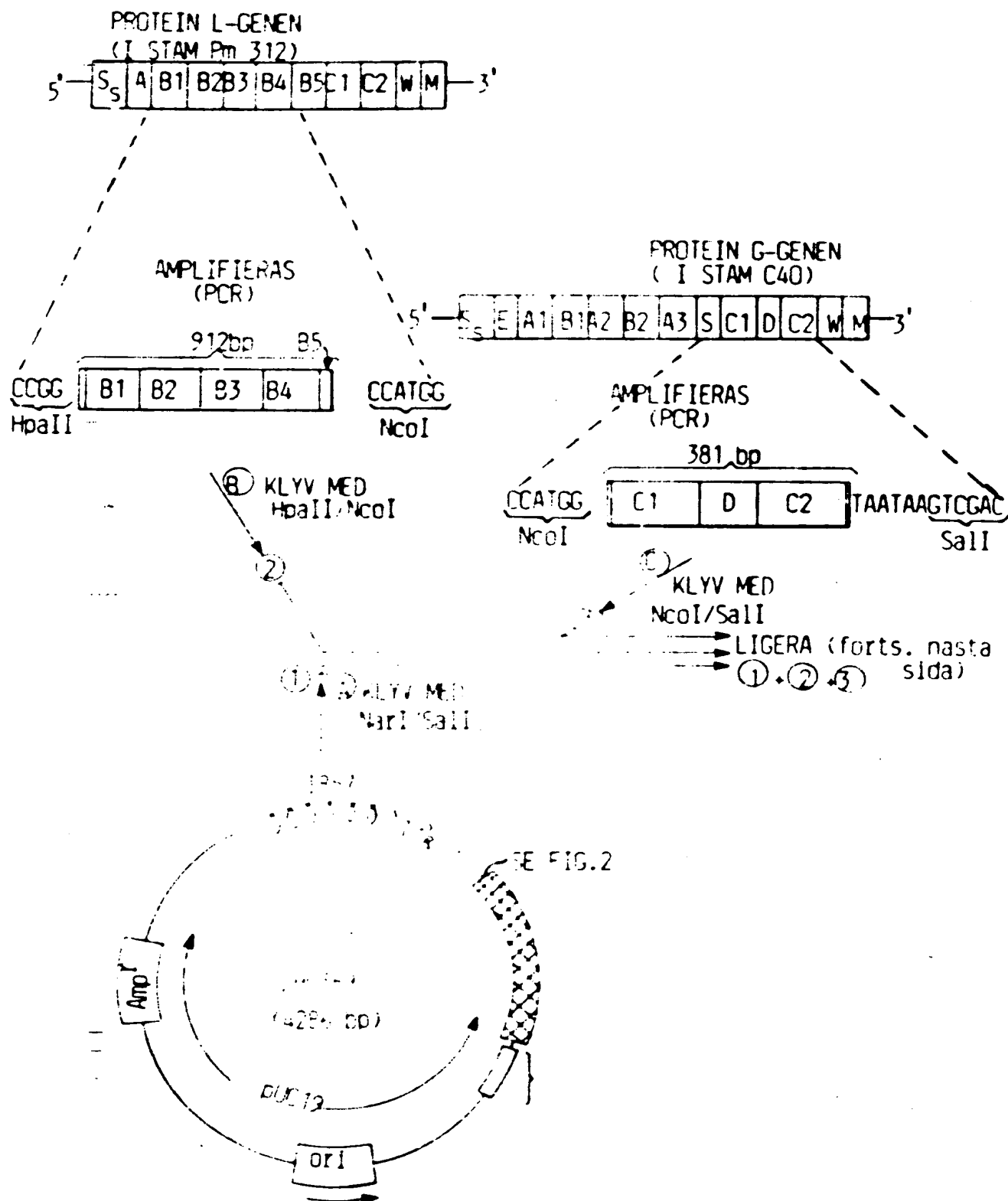
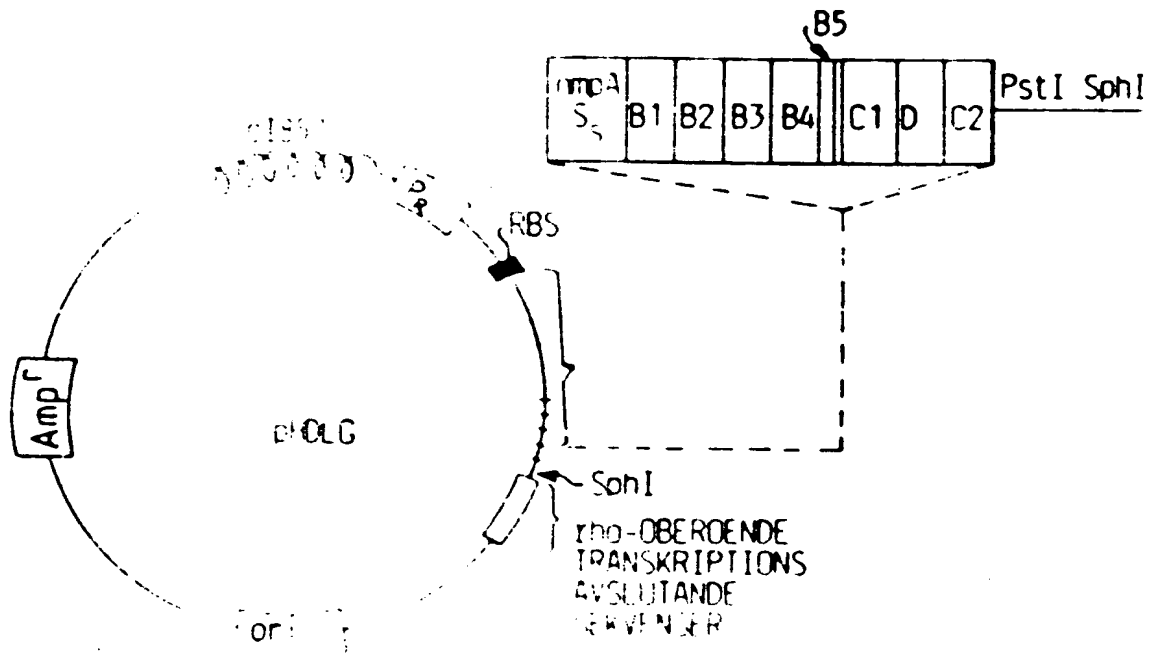


FIG.5(1)



TRANSFORMER
VIRUS
VIRUS

FIG.5(2)

FIG. 6a SCHEMATISK ÖVERSIKT FÖR FRAMSTÄLLNING AV PROTEIN LA

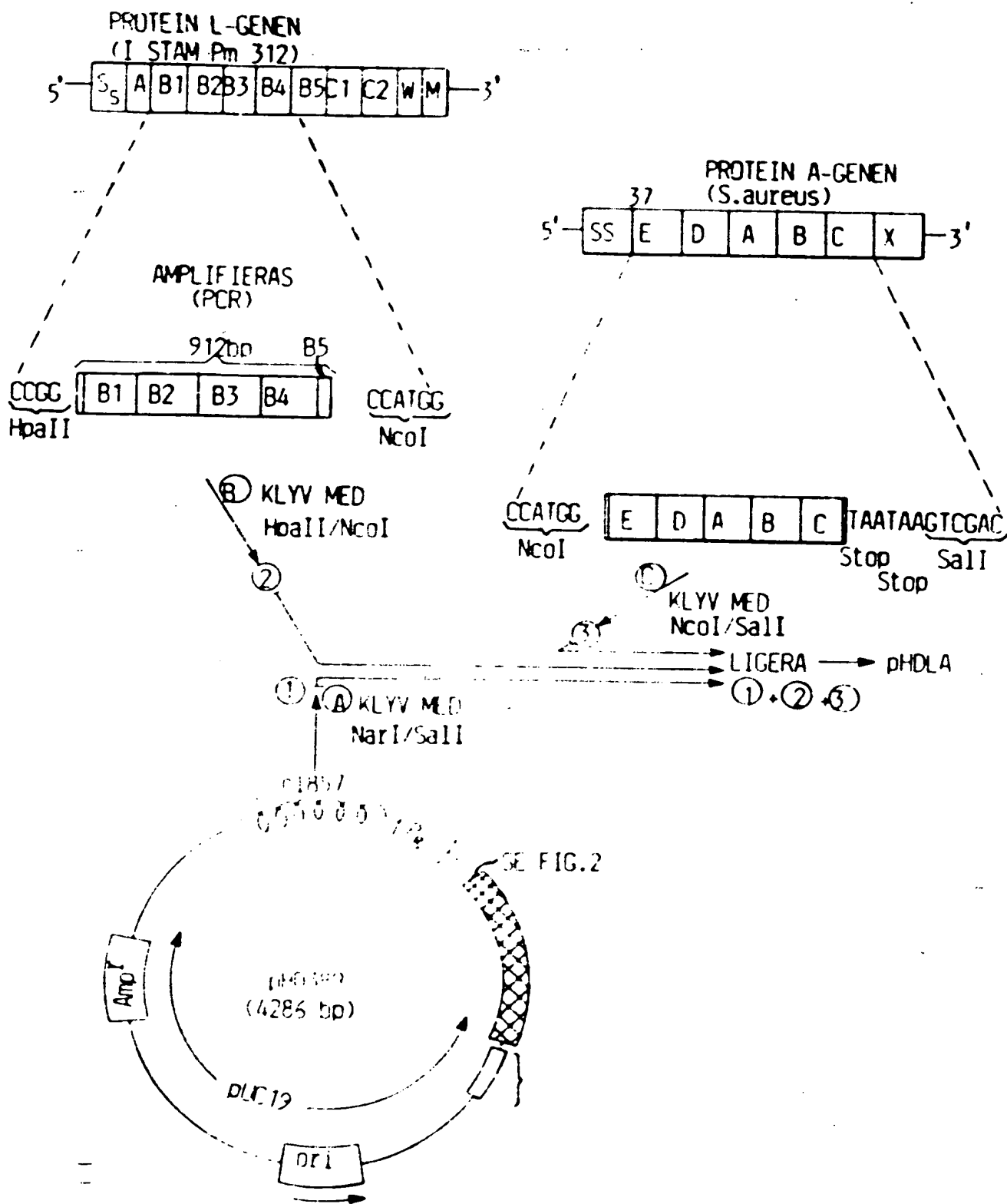


FIG.6b SCHEMATISK ÖVERSIKT FÖR FRAMSTÄLLNING AV PROTEIN LM

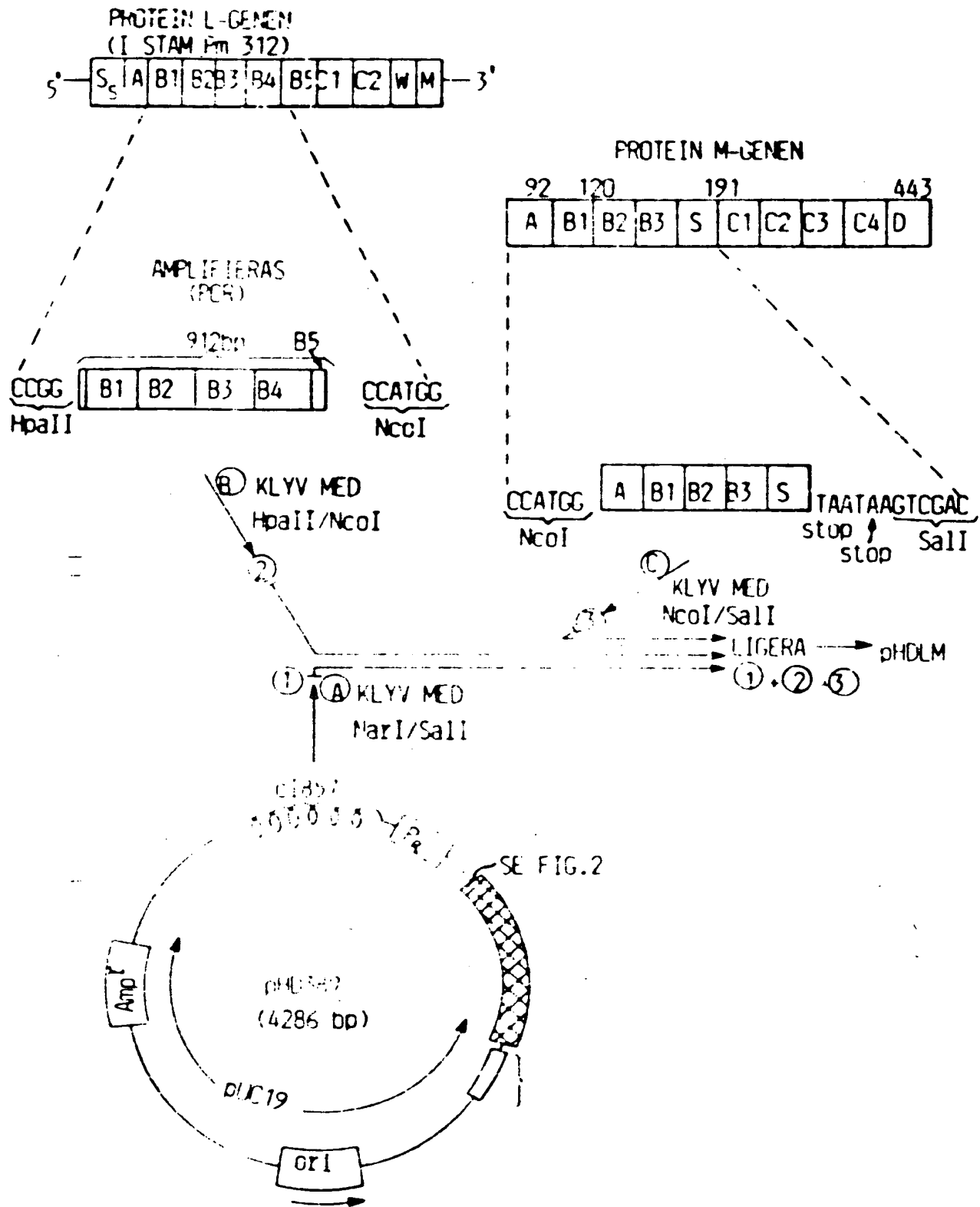
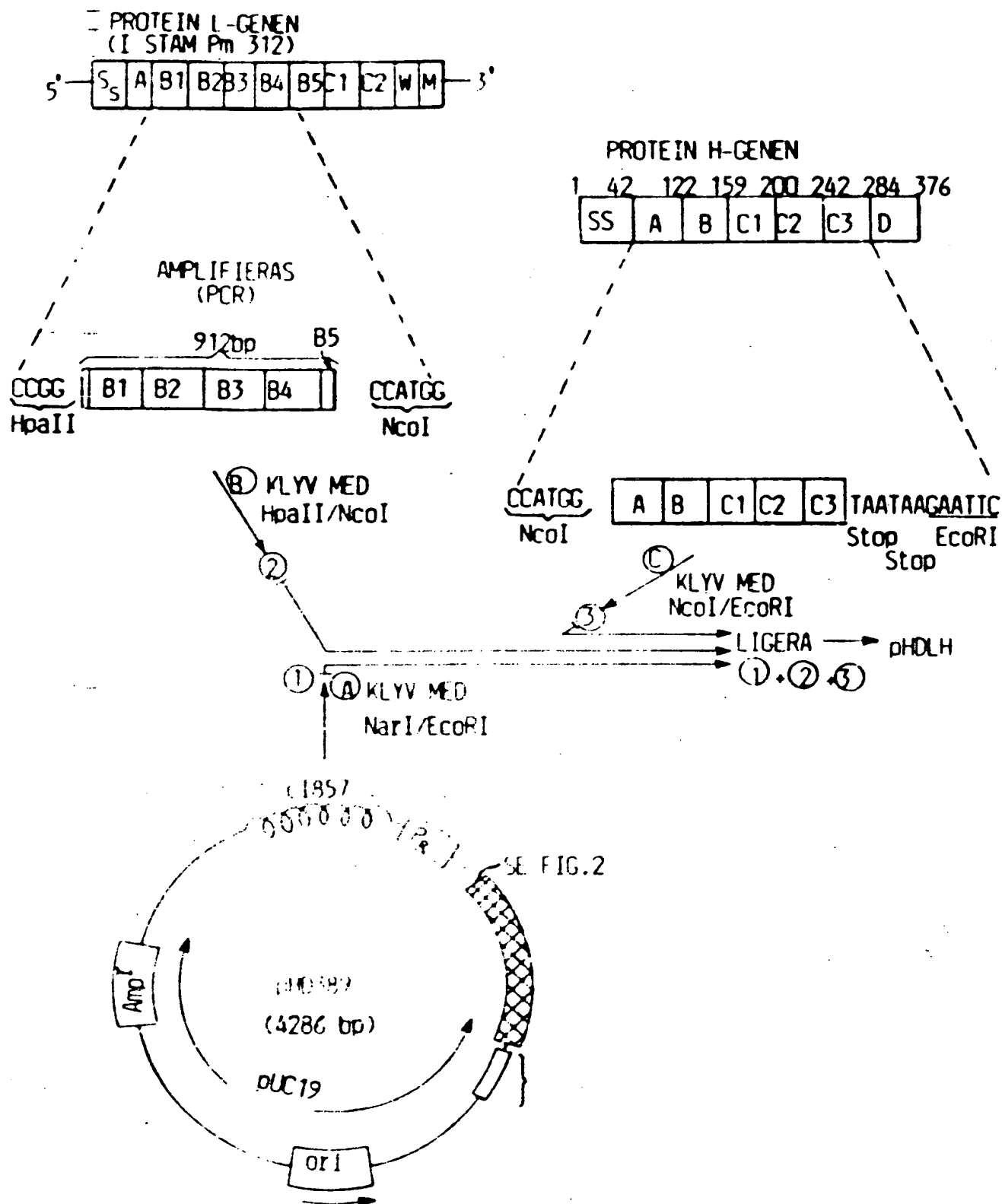
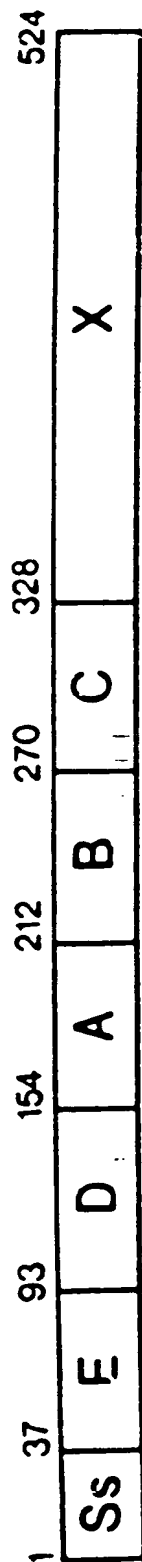


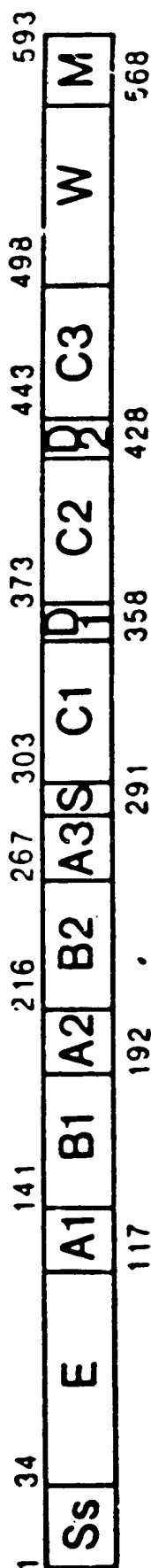
FIG. 6C SCHEMATISK ÖVERSIKT FÖR FRAMSTÄLLNING AV PROTEIN LH



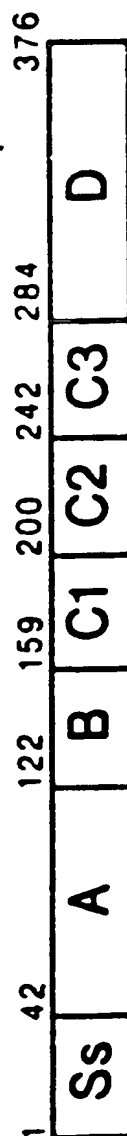
PROTEIN A



PROTEIN G

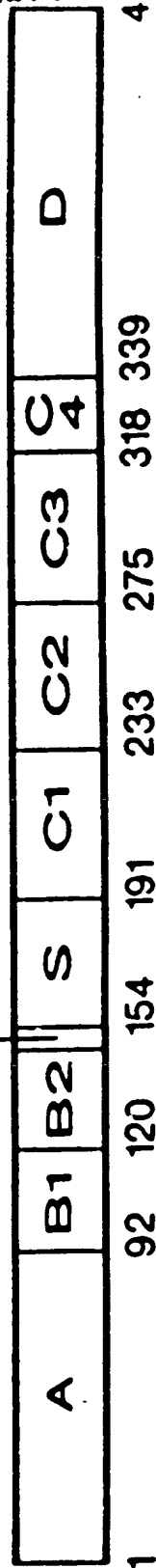


PROTEIN H



B3 (148-153)

M1 protein



ACCGGTGATCGTAATCCGGAAGTTATAGAAGATCTTGCAGCAAAATCCCTCAAT	60
AsnGluAsnGluAsnProArgGluValIleGluAspLeuAlaAlaAsnAsnProAlaIle	20
CAAAATATACGTTTACGTCACGAAACAAGGACTTAAAAGCGAGATTAGAGAATGCAATG	120
GlnAsnIleArgLeuArgHisGluAsnLysAspLeuLysAlaArgLeuGluAsnAlMet	40
GAAGTTGCAGGAAGAGATTTTAAGAGAGCTGAAGAACTTGAAAAAGCAAAACAAGCCTTA	180
GluValAlaGlyArgAspPheLysArgAlaGluGluLeuGluLysAlaLysGlnAlaL	60
GAAGACCAGCGTAAGATTTAGAACTAAATTAAAAGAACTACAACAAGACTATGACTTA	240
GluAspGlnArgLysAspLeuGluThrLysLeuLysGluLeuGlnGlnAspTyrAspLeu	80
GCAAAGGAATCAACAAGTTGGGATAGACAAGACTTGAAAAGAGTTAGAAAGAGAAAAAG	300
AlaLysGluSerThrSerTrpAspArgGlnArgLeuGluLysGluLeuGluGluLysLys	100
GAAGCTCTTGAATTAGCGATAGACCAGGCAAGTCGGGACTACCATAGAGCTACCGCTTTA	360
GluAlaLeuGluLeuAlaIleAspGlnAlaSerArgAspTyrHisArgAlaThrAlaLeu	120
GAAGAGAGGTTAGAAAGAGAAAAAGAAAGCTCTTGAATTAGCGATAGACCAGCGAGTCAG	420
GluLysGluLeuGluGluLysLysLysAlaLeuGluLeuAlaIleAspGlnAlaSerGln	140
GACTATAATAGAGCTAACGCTCTTAGAAAAAGAGTTAGAAALGATTACTAGAGAACAGAG	480
AspTyrAsnArgAlaAsnValLeuGluLysGluLeuGluThrIleThrArgGluGlnGlu	160
ATTAAATCGTAATCTTTTAGGCAATGCAAAAGCTTGAAGTTGATCAACTTTCATCTGAAAAA	540
IleAsnArgAsnLeuLeuGluAsnAlaLysLeuGluLeuAspGlnLeuSerSerGluLys	180
GAGCAGCTAACGATCGAAAAAGCAAAAGCTTGAAGAAAGAAACAAATCTCAGACGCAAGT	600
GluGlnLeuThrIleGluLysAlaLysLeuGluGluGluLysGlnIleSerAspAlaSer	200
CGTCAAAGCCTTCGTCGTGACTTGGACGCGATCAGCTGAAGCTAAGAAACAGGTTGAAAAA	660
ArgGlnSerLeuArgArgAspLeuAspAlaSerArgGluAlaLysLysGlnValGluLys	220
GATTTAGCAAACTTGACTGCTGAAGTTGATAAGGTTAAAGAAGACAAACAAATCTCAGAC	720
AspLeuAlaAsnLeuThrAlaGluLeuAspLysValLysGluAspLysGlnIleSerAsp	240
GCAAGCCGTCAACGGCTTCGCCGTGACTTGGACGCATCAGCTGAAGCTAAGAAACAGGTT	780
AlaSerArgGlnArgLeuArgArgAspLeuAspAlaSerArgGluAlaLysLysArg	

Fig. 8 Aminosyra- och nukleinsyrasekvens för protein M1,
IgG-bindning någonstans mellan aminosyra 1-190

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10

GAAGAAAGATTAGCAAACCTGACTGCTGAACCTTGATAAGGTTAAAGAAAGCAACCAAGTCTG	120
GluLysAspLeuAlaAsnLeuThrAlaGluLeuAspLysValLysGluGluLysGlnIle	
TCAGACCAAGCCCTCAACGGCTTCGCGTGAACCTTGAGACGCATCACGGAAGCTAAGAAA	240
SerAspAlaSerArgGlnArgLeuArgArgAspLeuAspAlaSerArgGluAlaLysLys	300
CAAGTTGAAAAGCTTTAGAAGAAGCAAACAGCAAATTAGCTGCTCTTGAAAACTTAAC	960
GlnValGluLysAlaLeuGluGluAlaAsnSerLysLeuAlaAlaLeuGluLysLysAsn	320
AAAGAGCTTGAAGAAAGCAAGAAATTAACAGAAAAAGAAAAGCTGAACCTACAAGCAAAA	1020
LysGluLeuGluGluSerLysLysLeuThrGluLysGluLysAlaGluLeuGlnAlaLys	340
CTTGAAGCAGAAGCAAAAGCACTCAAAGAACAATTAGCGAACAAGCTGAAGAACTCGCA	1080
LeuGluAlaGluAlaLysAlaLeuLysGluGlnLeuAlaLysGlnAlaGluGluLeuAla	360
AAACTAAGAGCTGGAAAAGCATCAGACTCACAAACCCCTGATACAAAACCAAGGAACAAA	1140
LysLeuArgAlaGlyLysAlaSerAspSerGlnThrProAspThrLysProGlyAsnLys	380
GCTGTTCCAGGTAAAGGTCAAGCACCACAAGCAGGTACAAAACCTAACCAAAALAAASCA	1200
AlaValProGlyLysGlyGlnAlaProGlnAlaGlyThrLysProAsnGlnAsnLysAla	400
CCAATGAAGGAAACTAAGAGACAGTTACCATCAACAGGTGAAACAGCTAACCCATTCTTC	1260
ProMetLysGluThrLysArgGlnLeuProSerThrGlyGluThrAlaAsnProPhePhe	420
ACAGCGGCACGCGTTACTGTTATGGCAACAGCTGGAGTAGCAGCAGTTGTAAAACGCAAA	1320
ThrAlaAlaArgValThrValMetAlaThrAlaGlyValAlaAlaValValLysArgLys	440
GAAGAAAACCTAA	1329
GluGluAsn	443

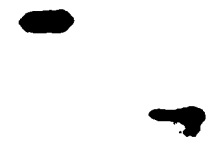
forts. fig. 8

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10

Protein LG
Protein L
Protein G

Protein LG
Protein L
Protein G

Protein LG
Protein L
Protein G



- 50 kDa
- 35 kDa
- 16 kDa

PROBE:

IgG

Ig kappa

IgG Fc

9204:23

0010017

THE PATENT

